631

ESTRATTO
dall'
Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia
Vol. XXXIII
FIRENZE — 1934.

Giuseppe Levi - Enzo Delorenzi.

Trasformazioni degli elementi dei gangli spinali e simpatici coltivati in vitro.

(Con 35 figure nel testo e Tav. XXXII-XXXVII).

FIRENZE
TIPOGRAFIA LUIGI NICCOLAI
—
1934

Al collega F. Venzetti
cordialmente
G Levi

Estratto dall'*Archivio di Anatomia* — Vol. XXXIII.

Istituto Anatomico di Torino.

Trasformazioni degli elementi dei gangli spinali e simpatici coltivati in vitro

di

Giuseppe Levi - Enzo Delorenzi.

(Con 35 figure nel testo e Tav. XXXII-XXXVII).

È vietata la riproduzione.

Si ritiene in genere che negli espianti in vitro di organi nervosi centrali non si manifesta, come nelle colture del connettivo, di muscoli, di epiteli, nè attiva migraziome, nè proliferazione di cellule. Il fatto più appariscente scoperto da HARRISON sarebbe l'accrescimento per movimento ameboide di fibre nervose.

Però dagli studi successivi a quelli di HARRISON e di BURROWS risultò che, contemporaneamente all'accrescimento di nuove fibre da neuroblasti indifferenziati, si ha rigenerazione di fibre mutilate all'atto dell'espianto, inoltre migrazione di cellule nervose e di cellule di altra natura, per quanto in misura più limitata che in colture di altri organi.

Coll'andar del tempo in espianti trapiantati per varie volte in un nuovo mezzo i neuroblasti regrediscono e le cellule epiteliali indifferenziate dell'espianto prevalgono. A differenza di quanto fu riconosciuto per alcuni epiteli, i quali possono conservare indefinitamente i propri caratteri, sembra che i neuroni abbiano vitalità limitata, essi regrediscono, e dopo un certo periodo di vita il tessuto nervoso è sostituito da un epitelio derivato da cellule indifferenti dall'espianto, privo di caratteri propri, che cresce indefinitamente (OLIVO).

La conoscenza delle trasformazioni alle quali sottostanno i neuroni in vitro durante il periodo di sopravvivenza e dei rapporti di interdipendenza reciproci fra di essi può, nonostante la loro vitalità limitata, condurre a risultati importanti sulle proprietà biologiche degli elementi nervosi.

Ricerche iniziate da qualche tempo nell' Istituto di Torino e che si ricollegano a quelle compiute in antecedenza da uno di noi e più tardi da Olivo, da Mossa e da Esaki, furono informate al programma di indagare tutto il complesso di fenomeni che si producono negli espianti di tessuto nervoso, cercando di seguire le modalità con cui a poco a poco si va trasformando la sua struttura originaria (1).

Le ricerche sulle culture di organi nervosi sono difficili; mentre nelle colture di altri tessuti, essendo la struttura dell'espianto originario ben conosciuta, si può seguirne le trasformazioni in vitro, le incertezze e le lacune nelle conoscenze sulla struttura del tessuto nervoso dell'organismo, rendono tale compito per le colture molto più arduo; e la difficoltà è tanto maggiore, che i metodi tecnici per la colorazione elettiva del tessuto nervoso spesso falliscono nelle colture. Inoltre nella maggior parte dei casi è impossibile di allevare in vitro cellule di un tipo determinato; anche quando si espianta un territorio ben conosciuto del cervello o del midollo, esso contiene neuroni di tipo differente. Ed infatti risulterebbe dalle osservazioni di Esaki che i caratteri delle colture sono diversi, a seconda della regione del sistema nervoso da cui l'espianto proviene. Questo risultato di Esaki fu contestato da Lazarenko, ma la questione non si può certo ritenere risolta.

In complesso queste ricerche sono ingrate; sarebbe vano sperare di ottenere in breve tempo risultati decisivi e brillanti. Per il momento dobbiamo intraprendere un'analisi minuziosa dei fenomeni che si producono nelle colture di vari organi nervosi, astenendoci dal trarne deduzioni affrettate sulla struttura del tessuto nervoso dell' organismo; quando quest' analisi sarà approfondita, si potrà forse trarre da questo complesso di ricerche risultati d' importanza generale.

---

(1) In una memoria in corso di stampa uno di noi ha voluto prospettare i fatti meglio fondati attinenti al destino degli espianti in vitro di tessuto nervoso e le interpretazioni di cui tali fatti sono suscettibili (G. Levi, Ergebn. d. Anat., Bd. 31). Nella suddetta memoria sono esposti diffusamente e discussi i risultati antecedenti dei vari Autori sulle colture di tessuto nervoso. Perciò riteniamo superfluo di diffonderci in questo scritto in richiami bibliografici particolareggiati, rimandando per ulteriori notizie all'opera sopra ricordata.

I gangli sensitivi del pollo essendo costituiti da neuroni di un solo tipo ed a struttura ben conosciuta e molto più semplice dei neuroni dell'encefalo e del midollo spinale, rappresentano un materiale di elezione per l'analisi delle trasformazioni a cui sono soggetti in vitro.

Materiale e tecnica.

Fu utilizzato il seguente materiale: Gangli spinali e del trigemello di embrione di pollo dal 5° al 16° giorno di incubazione, ganglio del trigemello di embrioni di 15 giorni. Una sola coltura fu ottenuta da un embrione più precoce (gangli encefalici di un embrione al 3° giorno). Inoltre furono coltivati gangli di embrioni e feti umani (di 20 mm., di 62 mm. e di 115 mm.) (1).

Non furono notate differenze sensibili fra le colture di gangli spinali ed encefalici (2), ed anche i risultati ottenuti da embrione di pollo e di uomo in linea generale concordano.

Furono espiantati complessivamente i gangli spinali di circa 30 embrioni di pollo, dai quali furono eseguite moltissime colture; di queste circa 500 furono utilizzabili per le nostre indagini.

La maggior parte delle colture furono allestite in goccia pendente; i gangli furono isolati con cura dal mesenchima circostante; quelli di embrioni dal 5° all' 8° giorno furono lasciati integri, quelli di embrioni più maturi furono suddivisi. I gangli di feti umani furono pure suddivisi. Soltanto una coltura ottenuta dall'embrione al 3° giorno fu allestita con tecnica un po' diversa. Furono preparati espianti della testa e questi furono posti in una bottiglia di Carrel, sul fondo della quale era stato posto un vetrino ricoperto dal plasma.

È noto che i gangli spinali sono nel pollo intimamente connessi ai gangli simpatici ed anzi nei gangli della regione toracica riesce difficile di separare gli uni dagli altri. Però in alcuni gangli questo fu possibile. Ed anche quando i due gangli non furono se-

---

(1) Dobbiamo alla cortesia del Prof. Cova se ci fu possibile di utilizzare questo materiale umano subito dopo la laparatomia.

(2) Non ci soffermeremo sulle fantastiche affermazioni di L. Kiss sull'esistenza di neuroni simpatici nei gangli encefalici; uno di noi se ne occupò in altra pubblicazione (Levi, Anat. Anz., Bd. 75), ed alle sue critiche si sono associati di recente, senza riserve, Fisher e Ranson (Journ. of Anat. 78) adducendo, ciò che più importa, altri dati di fatto positivi.

parati, le zone di accrescimento ottenute da ciascuno dei due erano riconoscibili, nonostante le sensibili analogie che esse talora presentano.

Nelle colture in goccia pendente il plasma fu diluito con liquido Tyrode in varia proporzione e con aggiunta di estratto di embrioni. Altre furono coltivate in plasma puro ed anche in succo di embrioni puro.

Furono intraprese ricerche preliminari destinate a ricercare, se per la varia composizione del terreno nutritivo o per la varia temperatura alla quale la coltura fu incubata, a 36° od a 40°, si hanno colture qualitativamente o quantitativamente diverse.

Premettiamo che anche in espianti coltivati nello stesso mezzo ed alla medesima temperatura si manifestano grandi differenze: talora si ha accrescimento di sole fibre libere od anastomizzate. Altre volte appaiono nella zona di migrazione accanto alle fibre delle cellule mesenchimali, lemnoblasti e cellule nervose. Dimodochè in vista di questa variabilità, riesce difficile decidere in quanto condizioni estrinseche modifichino i caratteri della coltura.

Certamente non risultarono differenze qualitative e neppure quantitative, vale a dire nel numero delle fibre cresciute nel plasma, per la temperatura alle quale la coltura viene incubata. In quanto all' influenza delle proprietà del mezzo nutritivo, risultò confermato il fatto, ben noto a chi ha una certa esperienza di colture di tessuto nervoso, che in espianti in un grosso strato di plasma non diluito con liquido Tyrode e senza aggiunta di succo di embrioni, il numero di fibre cresciute e di cellule emigrate è più scarso che in quelle coltivate in plasma diluito.

La formula da noi usata era la seguente : Plasma 0,5, liquido Tyrode 0,5, succo di embrioni 1 : altre volte la diluizione del plasma era anche maggiore. Il mezzo della composizione suaccennata si palesò come optimum per un accrescimento delle fibre nervose. Le colture furono studiate viventi seguendone le trasformazioni nel termostato a 38°. Per il rilevante spessore e per la notevole refrangenza che hanno spesso le fibre cresciute dai gangli espiantati, questo materiale si presta molto bene all'osservazione in vivo anche coi più forti ingrandimenti.

Risultati anche più interessanti furono ottenuti col metodo di registrazione cinematografica. I vantaggi di questo metodo sono ben noti ed esso è già da molti anni divenuto uno strumento di lavoro abituale nelle mani di chi si occupa di colture di tessuti (vedi le ricerche di Braus, di Canti, di A. Fischer, di Höfer, di Huzella).

Non mi risulta però che il metodo sia stato usato in ricerche sovra colture di tessuto nervoso.

Per la lentezza con cui la maggior parte di questi fenomeni avvengono, l'osservazione microscopica continuata della coltura vivente difficilmente riesce a darne una rappresentazione esatta. Se invece siespone la coltura ad intervalli regolari, che dovranno essere più o meno lunghi a seconda della velocità con cui la coltura si trasforma, proiettando il film a velocità normale (da 16 a 20 imagini al secondo) la successione dei fenomeni viene artificialmente molto accelerata e perciò ben apprezzabile all'osservatore.

Non mi diffonderò in troppi particolari tecnici ; per lo più si dimostrò sufficiente l' ingrandimento ottenuto coll'obbiettivo Apocromatico 16 mm. Zeiss, oculare Homal 2 ; qualche volta fu adoperato l' Obiettivo Apocromatico 8 mm. Come sorgente luminosa fu usata una lampada ad incandescenza Wotan Nitra di 6 Volt, 5 Ampère. Le esposizioni ad intervalli regolari furono ottenute col noto « Zeitraffer » dell' Askania.

In una ricerca preliminare il film fu eposto ad intervalli di 60 secondi ; ma in tal caso l'accrescimento delle fibre appare troppo veloce e non può essere analizzato sullo schermo nei suoi particolari. Perciò abbiamo preferito esposizioni più frequenti, ad intervalli di 20 secondi.

Le osservazioni su colture viventi furono integrate con quelle sovra colture fissate e colorite in toto. I risultati ottenuti colla colorazione « in toto » delle colture furono così favorevoli, che abbiamo ritenuto superfluo il ricorrere al metodo (certamente più imperfetto) delle sezioni microtomiche. Gli svantaggi di questo metodo per l'analisi microscopica delle colture sono infatti ben noti ; per l'imbibizione dei tessuti espiantati questi sono molto modificati dal procedimento d' inclusione, e nel caso particolare delle colture del tessuto nervoso, i rapporti vicendevoli fra le fibre nervose sono difficilmente rintracciabili, perchè queste appaiono suddivise in frammenti e non possono essere seguite in tutto il loro tragitto come nelle colture « in toto ».

Le imagini più dimostrative, nella colorazione delle colture in « toto » si ebbero con opportune modificazioni del metodo Cajal all'argento ridotto. Fu usata la formula di De Castro-Esaki (fissazione in soluzione alcoolica di idrato di Cloralio). Però neppure con questa tecnica si hanno risultati costanti, anche se il soggiorno nella soluzione di Nitrato d'argento viene prolungato sino a 14-16 giorni, probabilmente perchè lo strato di plasma è poco favorevole per la diffusione della soluzione di argento. Abbiamo tratto grande vantaggio dalla seguente modificazione : la coltura dopo il soggiorno nella soluzione argentica e dopo lavaggio in acqua corrente viene ridotta, come di consueto, per pochi minuti in acido pirogallico (diluendolo alquanto con acqua distillata). Se, come il più sovente accade, la colorazione delle fibre e delle cellule nervose è insufficiente, la coltura viene immersa in una soluzione di Nitrato d' argento alla temperatura di 37°.

Col controllo al microscopio si apprezza quando la colorazione ha un'intensità sufficiente, per lo più dopo 10-30 minuti.

In un primo tempo si colorano le cellule dell'espianto originario, più tardi le fibre cresciute nel plasma e le cellule nervose emigrate. Di solito

quando si colorano distintamente gli elementi della zona di invasione, le cellule dell'espianto si colorano troppo intensamente. L'esperienza insegna quando si deve arrestare la colorazione al momento voluto. Dopo breve lavaggio in acqua corrente la coltura viene immersa nel riduttore (acido pirogallico) per 1-2 ore. Si lava di nuovo in acqua corrente e si procede, se è necessario, alla rimozione per via meccanica (con un pennello di fili di cotone) del precipitato d'argento aderente alla superficie inferiore del plasma (secondo il suggerimento di ESAKI).

Nelle colorazioni ben riescite le cellule di natura non nervosa (fibroblasti e lemnoblasti) rimangono quasi incolore ; se esse hanno una tinta bruno-rossastra, gli elementi nervosi non risaltano a sufficienza. La colorazione in tal caso si deve considerare come non riescita. Il viraggio dell'oro è nella maggior parte dei casi superfluo ed anzi, per la colorazione intensa che assumono le cellule mesenchimali, risultò poco vantaggioso. Solamente nelle colture a plasma spesso può essere utile il trattamento con permanganato potassico ed acido ossalico, il quale rende più trasparente il fondo (secondo VERATTI); in tal caso è indispensabile il viraggio preliminare all'oro. Però con questo procedimento le più sottili fibre quasi sempre si scolorano.

Anche la colorazione con ematossilina molto diluita di Held dopo fissazione in liquido Zenker, ci diede ottimi risultati, sebbene la colorazione non sia mai così elettiva, come nei preparati all'argento. Una lunga esperienza ci ha insegnato a preferire caso per caso, dopo attento esame della coltura vivente, a seconda dello spessore del plasma e di altre condizioni sulle quali non insistiamo, l'uno o l'altro di questi metodi.

CARATTERI GENERALI DELLE COLTURE DI GANGLI.

Faremo precedere all'analisi dei fenomeni che si svolgono nelle colture di gangli una succinta descrizione del modo come il loro aspetto complessivo si vada modificando in ordine cronologico. Fu già detto che i caratteri morfologici delle colture, anche se ottenute da embrioni allo stesso stadio ed allevate nelle stesse condizioni, differiscono per cause imponderabili.

Sappiamo che lo stesso si verifica anche nelle colture di altri organi, ma in quelle di gangli la variabilità è anche maggiore.

Però abbiamo riconosciuto che, a conferma di quanto ESAKI aveva visto, nonostante questa variabilità, esse hanno alcuni caratteri propri, per cui differiscono moltissimo da quelle di encefalo e di midollo. Ciò vale tanto per le colture di embrione di pollo che per quelle di embrione e feto umano. La principale peculiarità delle cellule dei gangli sta nel fatto che quasi sempre le fibre assumono rapporti di interdipendenza vicendevoli complicati formando

plessi ed anastomizzandosi : inoltre nelle colture di gangli emigrano quasi sempre nel coagulo cellule che non hanno caratteri di elementi nervosi, alcune delle quali si pongono in rapporti materiali stretti colle fibre nervose. Le suddette caratteristiche si manifestano in modo quasi costante, sebbene in vario grado, indipendentemente dalla maturità che il ganglio aveva nell'embrione all'atto dell'espianto. Con ciò non intendiamo di dire, che colture di gangli di embrioni precoci ed inoltrati siano identiche. Però in vista della variabilità che le colture, anche se ottenute da gangli a pari grado di maturità presentano, riesce difficile di stabilire quale importanza abbia il grado di sviluppo dell'embrione nel determinare i vari caratteri della coltura.

Poche ore dopo che il ganglio fu espiantato appaiono lungo il suo orlo le prime fibre nervose. Alcune sono isolate, come nella maggior parte delle colture di encefalo e di midollo, soltanto sono più robuste e tanto più, quanto più maturo è il ganglio espiantato. Più sovente si vedono grossi tronchi a struttura fibrillare, alcuni dei quali crescono liberamente per attività ameboide dell'espansione terminale, altri sono, sin dal momento in cui fanno la prima comparsa, anastomizzati, costituendo un trabecolato grossolano. Inoltre migrano nel plasma cellule nervose a forma irregolare, spesso appiattite, che emettono molti tozzi prolungamenti. Nelle ore successive le fibre che crescono nel coagulo si fanno sempre più numerose, e nello stesso tempo quelle che prima delle altre erano apparse crescono in lunghezza e si ramificano. Inoltre quasi sempre le fibre, che dapprima erano libere, si anastomizzano mediante rami collaterali. Anche i grossi tronchi ed i prolungamenti delle cellule nervose emigrate si suddividono e partecipano alla formazione della rete.

In una coltura ben riescita dopo circa 40 ore si vede che l'espianto originario è circondato da fibre nervose orientate sempre radialmente rispetto all'espianto. Esse sono a vicenda isolate o riunite a fasci o disposte a plesso. Si tenga inoltre presente che nelle varie regioni di una stessa coltura le fibre possono avere caratteri diversi.

In un periodo ulteriore emigrano dall'espianto cellule mesenchimali appiattite, fusiformi od a forma irregolare, con prolungamenti tozzi. Questi ultimi elementi nei gangli di embrioni al 5° giorno emigrano precocemente ed in numero rilevante, il che rap-

presenta un elemento poco favorevole per lo studio delle fibre nervose, perchè sovrapponendosi ad esse le mascherano.

Negli espianti di gangli più maturi la migrazione di cellule non nervose è frequente ma non costante, ed ad ogni modo sempre più tardiva e meno abbondante.

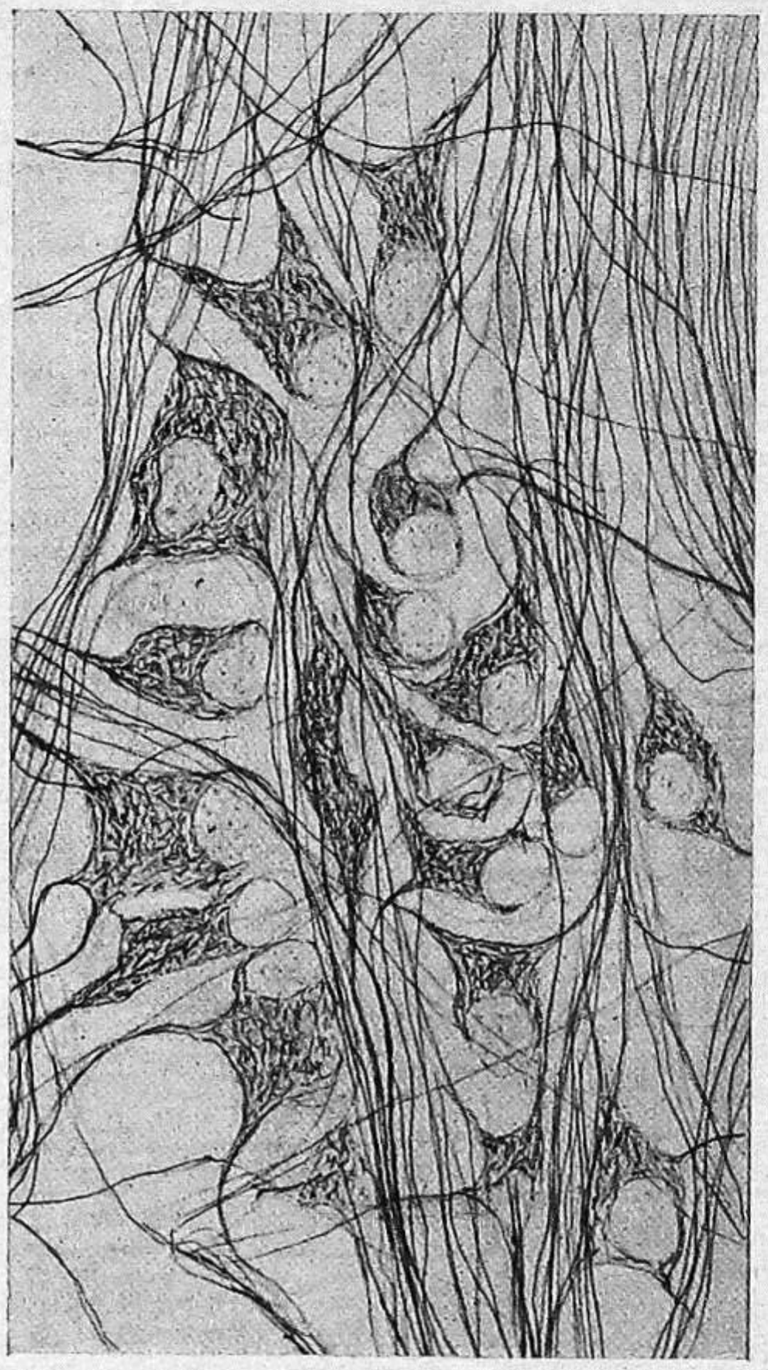

Fig. 1. — Da un espianto della testa di un embrione di pollo di 3 giorni, coltivato per giorni 5 in bottiglia di Carrel (v. testo). Ganglio encefalico (probabilmente trigemello), nel quale le cellule nervose si sono sparse per migrazione attiva; esse si sono differenziate in vitro, hanno un volume relativamente considerevole, mancano cellule indifferenti. Si noti che tutte le cellule nervose hanno presso a poco la stessa grandezza; i neuriti non sono più ai poli, in varie cellule si sono ravvicinati. Varie cellule con 3 neuriti. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 475 ×.

Un altro fenomeno si manifesta infine in alcune colture, ma sempre tardivamente, lo scorrimento degli elementi dell'espianto originario, per cui esso diviene molto sottile e trasparente.

Le differenze nei caratteri delle colture dipendono dall' interferirsi di varie condizioni: quantità delle fibre cresciute, rapporti vicendevoli che fra esse intercedono, se isolate, se disposte a cordoni,

a plesso od a rete ; numero delle cellule migrate, (elementi nervosi, mesenchimali, lemnoblasti) ; caratteri dell'espianto originario ; se è avvenuto o meno uno scorrimento delle cellule nervose. L'accresci-

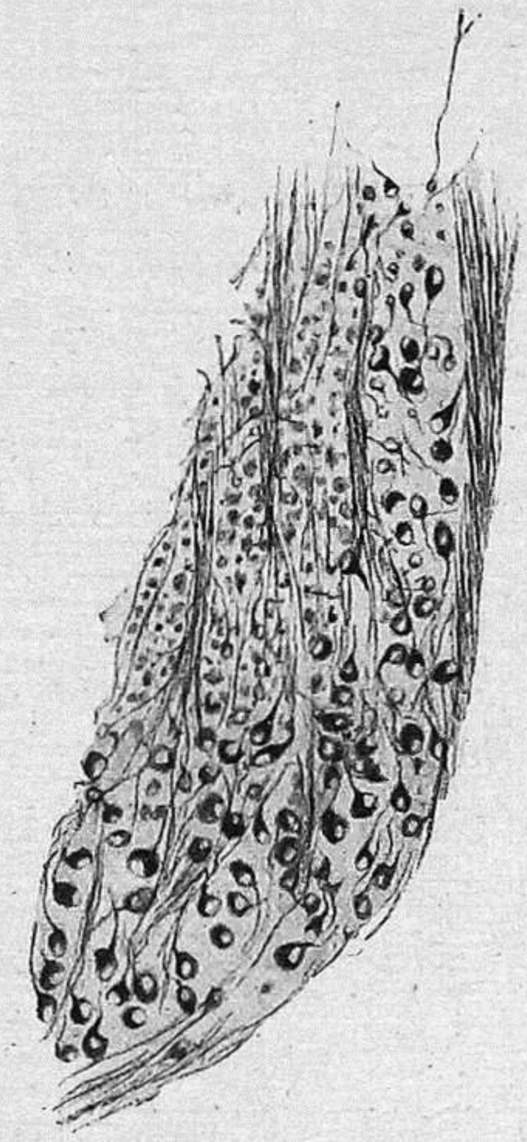

Fig. 2. — Sezione microtomica di un ganglio lombare di embrione di pollo di 7 ½ giorni di incubazione. A destra ed in basso cellule differenziate (nella figura appaiono in prevalenza unipolari, in realtà in tutte si debbono essere formati ambedue i neuriti). In alto ed a sinistra qualche neuroblasta molto piccolo, in prevalenza cellule indifferenti. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 165 ×.

mento delle fibre nervose diviene più lento dopo 48 ore, però quasi sempre le fibre continuano a crescere anche durante il 3° giorno di vita e perciò i caratteri generali della coltura si trasformano ancora.

Trasformazioni dei neuroni sensitivi in seno agli espianti originari.

Nelle pubblicazioni di Mossa 1928 e di Esaki 1929 vi è qualche accenno in proposito. Mossa studiando le trasformazioni delle cellule dei gangli in espianti tagliati al microtomo avrebbe visto che il destino delle medesime varia sensibilmente da una coltura all'altra. Se il ganglio proviene da embrioni inoltrati nello sviluppo, le cellule sopravvivono ma non si evolvono, altre volte fu constatato accrescimento in volume di cellule differenziate, ed evoluzione di quelle rimaste indifferenti. Oppure le cellule perdono la forma specifica, emigrano nel coagulo, ed emettono propaggini nastriformi. Esaki

ha notato che le cellule dell'espianto si discostano le une dalle altre, crescono di volume, pur serbando caratteri tipici. Molte di esse hanno ancora forma bipolare, altre divengono unipolari, altre ancora emettono prolungamenti, che terminano a breve distanza con rigonfiamenti sferici o clavati. Più tardi alcune cellule isolate emigrano dal tessuto originario e la disposizione degli elementi in seno a questo diviene ancor più lassa. In molti gangli ottenuti da embrioni dal 5° al 10° giorno e coltivati col metodo Maximow per 8-10 giorni, ESAKI ha visto le singole cellule gangliari circondate da amficiti seminulari aderenti al contorno della cellula nervosa. La disposizione è esattamente la medesima di quella dei gangli di embrioni normali al di là del 10° giorno d' incubazione. Dopo 6-10 giorni di vita in coltura gli amficiti abbandonano la loro sede intorno alle cellule gangliari, emigrano lungo le fibre nervose ed assumono caratteri simili a quelli delle cellule satelliti delle fibre (lemnoblasti).

In molte colture ci fu concesso di seguire i mutamenti di sede e di forma delle cellule gangliari in seno all'espianto.

Ciò riesce meglio in colture colorite in toto che nelle sezioni microtomiche, purchè il tessuto originario si sia spontaneamente assottigliato in una lamina, nella quale le cellule nervose si sono disposte in un unico piano. Lo stesso fu constatato in espianti di altri organi (da LEVI in frammenti del tronco di embrioni precoci di abbozzi di muscoli, di tegumento, del tessuto scheletogeno della volta del cranio, da RIENHOFF in frammenti di rene).

Negli espianti di gangli nei quali è avvenuto lo scorrimento delle cellule, al 2°-3° giorno di coltura le celluie gangliari appaiono sparse (figg. 3-5, Tav. XXXII-XXXIII, fig. *b*, *c*) ; da esse partono i neuriti, che, invece di scegliere la via più breve verso il plasma, sovente si dirigono verso la parte profonda del ganglio, arrivando al margine opposto del coagulo ; comunque descrivono spesso volute molto complicate, tanto più, quanto più inoltrato nello sviluppo era il ganglio espiantato (figg. 4, 5, 12, 17, Tav. XXXII-XXXIII, fig. *c*); però talvolta, specialmente in espianti di gangli di embrioni giovani, arrivano alla periferia per la via più breve (fig. 3).

L'espianto è percorso adunque da molti neuriti che s' intersecano nelle direzioni le più diverse. Al limite fra tessuto originario e plasma quasi sempre i neuriti percorrono un tratto tangenzialmente al contorno del primo, (figg. 3, 5) addensandosi in un intreccio complesso. Ciò fa pensare che i neuriti trovino un ostacolo a precedere nel plasma, in modo che essi dapprima crescano lungo il margine del tessuto, mezzo più favorevole all'accrescimento e penetrino nel plasma in un secondo tempo.

Negli intervalli fra le cellule gangliari vi sono piccoli elementi sferici che non si colorano col metodo Cajal (figg. 3, 4); sono in parte

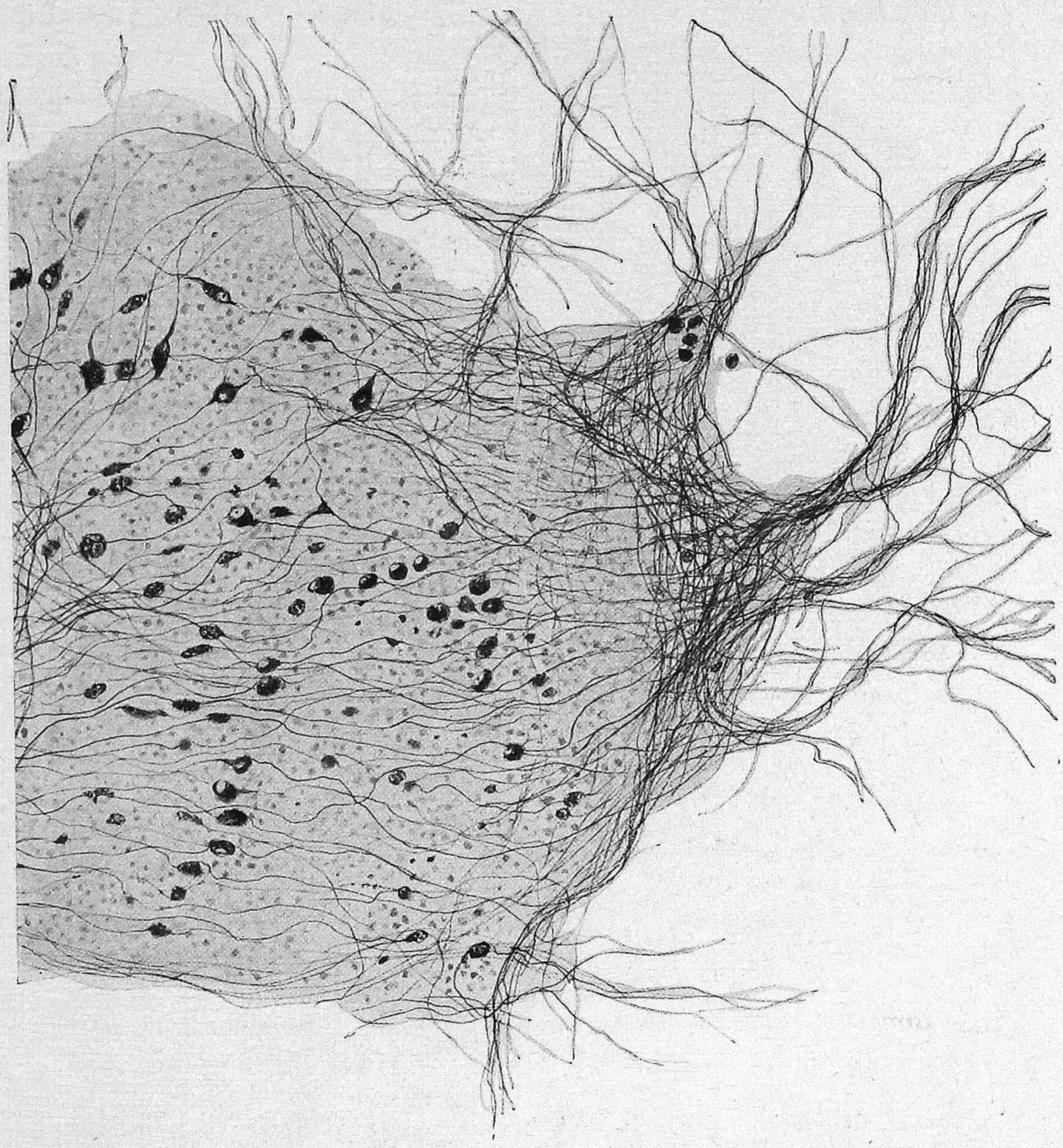

Fig. 3. — Coltura (N. 2427). Ganglio spinale di embrione di pollo (10° g. d'incub.). Cellule nervose che si sono sparse in seno all'espianto per migrazione attiva. Poche cellule nervose differenziate, negli intervalli elementi indifferenti in regressione. Le cellule sono bipolari con neuriti ai poli opposti. Poche cellule multipolari. I due neuriti raggiungono la periferia dell'espianto per la via più breve. Al limite fra espianto e plasma fitto intreccio di neuriti orientati tangenzialmente all'espianto; da questa zona intermedia si dirigono nel plasma neuriti liberi, dapprima riuniti a fasci, più oltre dissociati. Non vi sono anastomosi. Metodo all'argento ridotto. Ingran. 165 ×.

mesenchimali, in parte sono elementi indifferenti derivati dall'abbozzo del ganglio; la proporzione rispettiva fra queste cellule, le

quali il più spesso sono in via di regressione, e le cellule nervose differenziate, varia molto in relazione allo stadio di sviluppo del

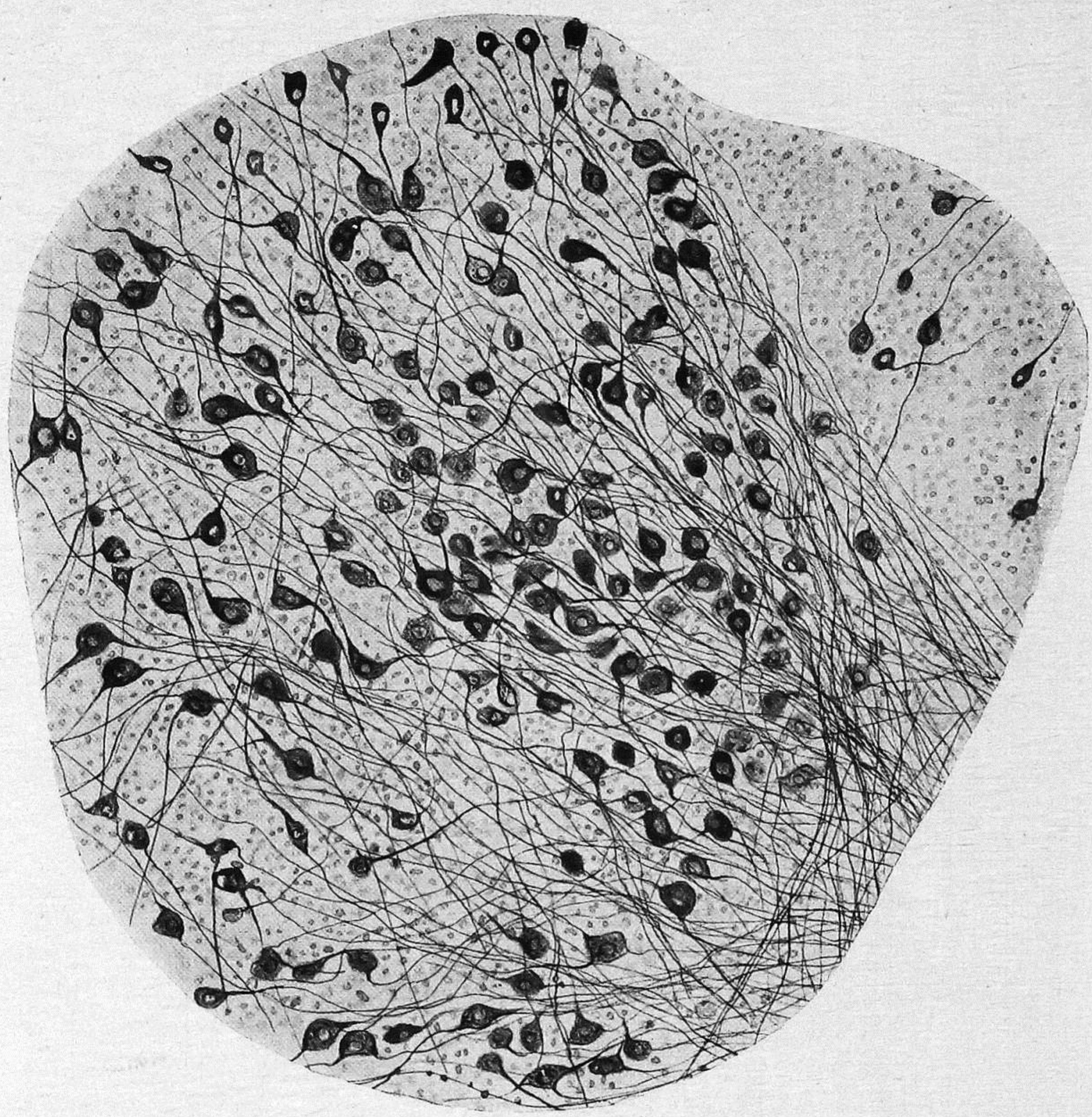

Fig. 4. — Coltura (N. 2420). Ganglio di embrione di pollo (10° g. d'incubaz.). Cellule nervose dell'espianto sparse per migrazione attiva; negli intervalli cellule indifferenti in regressione. In confronto della coltura riprodotta a fig. 3 le cellule nervose differenziate sono molto più numerose e molto più grandi. Le cellule hanno per lo più due neuriti, ai poli opposti, alcune altre 3 o più neuriti. I neuriti arrivano al plasma con tragitto rettilineo. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 165 ×.

ganglio, varia pure però anche in espianti da ganglio a pari gradi di maturità (figg. 4, 5). Non meno variabile è l'incremento di volume che è avvenuto in vitro delle cellule gangliari, in confronto al

volume che avevano nell'embrione al momento in cui i gangli furono espiantati, incremento il quale rappresenta l' indice meglio tangibile del grado di differenziazione raggiunto (cfr. figg. 4, 5 con fig. 2).

Vediamo ad es. che le cellule nervose in una coltura di gangli encefalici di un embrione di 3 giorni sono cresciute molto di volume

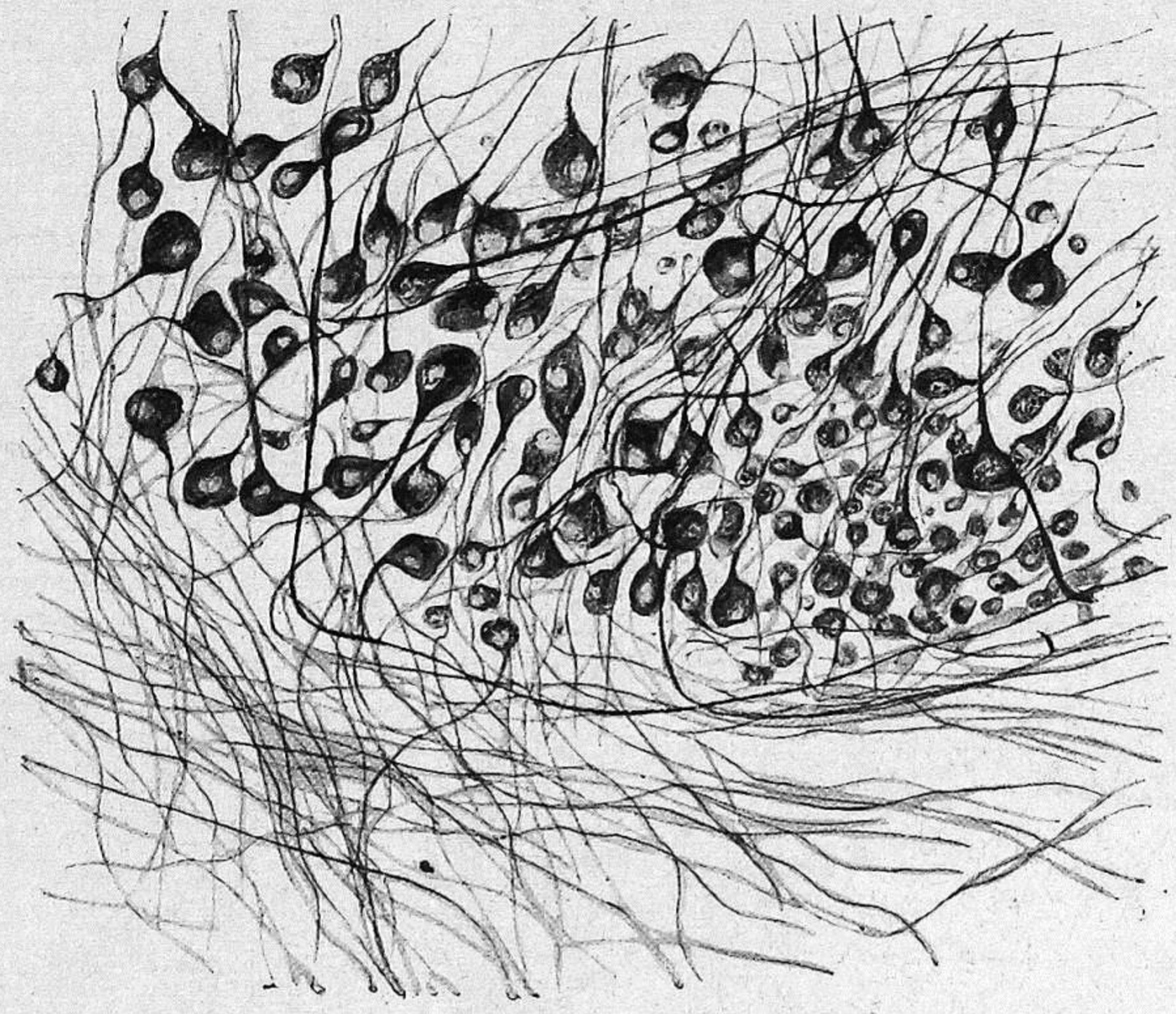

Fig. 5. — Una parte dell'espianto della coltura riprodotta nella Tav. XXXII, fig. *b*, al limite fra espianto e plasma. Tutte le cellule del ganglio o quasi si sono differenziate in vitro, ma non hanno pari grado di maturità ; alcune sono molto grandi, altre piccole. Anche in questa coltura al limite fra espianto e plasma molte fibre decorrono tangenzialmente all'espianto. Ingr. 165 ×.

(durante 5 giorni di vita in vitro) ; inoltre non vi sono nella coltura cellule rimaste arretrate, come nei gangli dell'embrione, ma hanno quasi tutte la stessa grandezza (fig. 1). Differenze individuali nel grado di differenziazione di espianti a pari grado di sviluppo appaiono da un confronto fra le colture riprodotte nelle figg. 3, 4, 5, le quali furono tutte tre ottenute da embrioni al 10° giorno di incubazione. Nella fig. 3 le cellule nervose sono poche, sparse in mezzo ad un gran numero di elementi indifferenziati in via di regressione, e per di più le cellule hanno ancora un carattere giovanile. Invece

in altre colture (figg. 4, 5) le cellule nervose son molto più numerose e più grandi. Però per un particolare anche queste ultime due colture differiscono l'una dall'altra ; che nella prima le cellule hanno presso a poco lo stesso grado di maturità (fig. 4) mentre nella se-

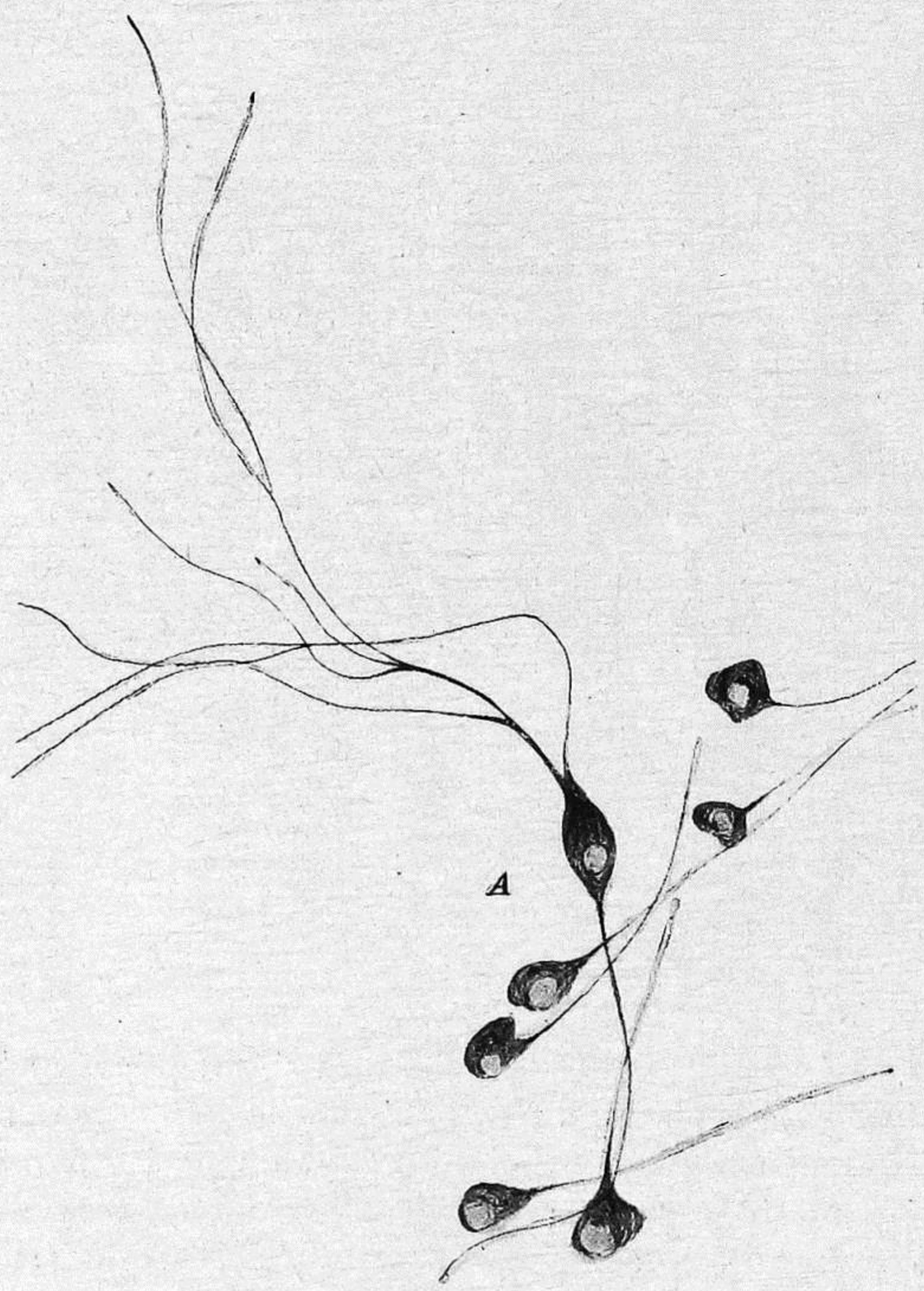

Fig. 6. — Coltura (N. 2329) da un ganglio spinale di embrione di pollo (10° g. d'incubaz.). Migrazione attiva delle cellule in seno all'espianto come nelle figure precedenti. Varie cellule unipolari. La cellula A ha 3 neuriti; uno di questi si suddivide ripetutamente nell'espianto; i suoi rami sono cresciuti nel plasma. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 280×.

conda persistono molte piccole cellule provviste bensì di neuriti, ma ad un grado di evoluzione meno progredito (fig. 5).

Anche in colture ottenute da espianti molto più maturi si è avuto in vitro un incremento sensibile di volume delle cellule ; ed anche in queste si vede sovente che le cellule nervose hanno quasi tutte presso a poco lo stesso volume ; vi è adunque la tendenza ad

un livellamento delle varie cellule del ganglio, mentre nei gangli dell'embrione le cellule hanno per un lungo periodo un vario grado di maturità.

Di solito finchè le cellule migrate in seno all'espianto non oltrepassano il margine di queste, conservano la forma che è tipica

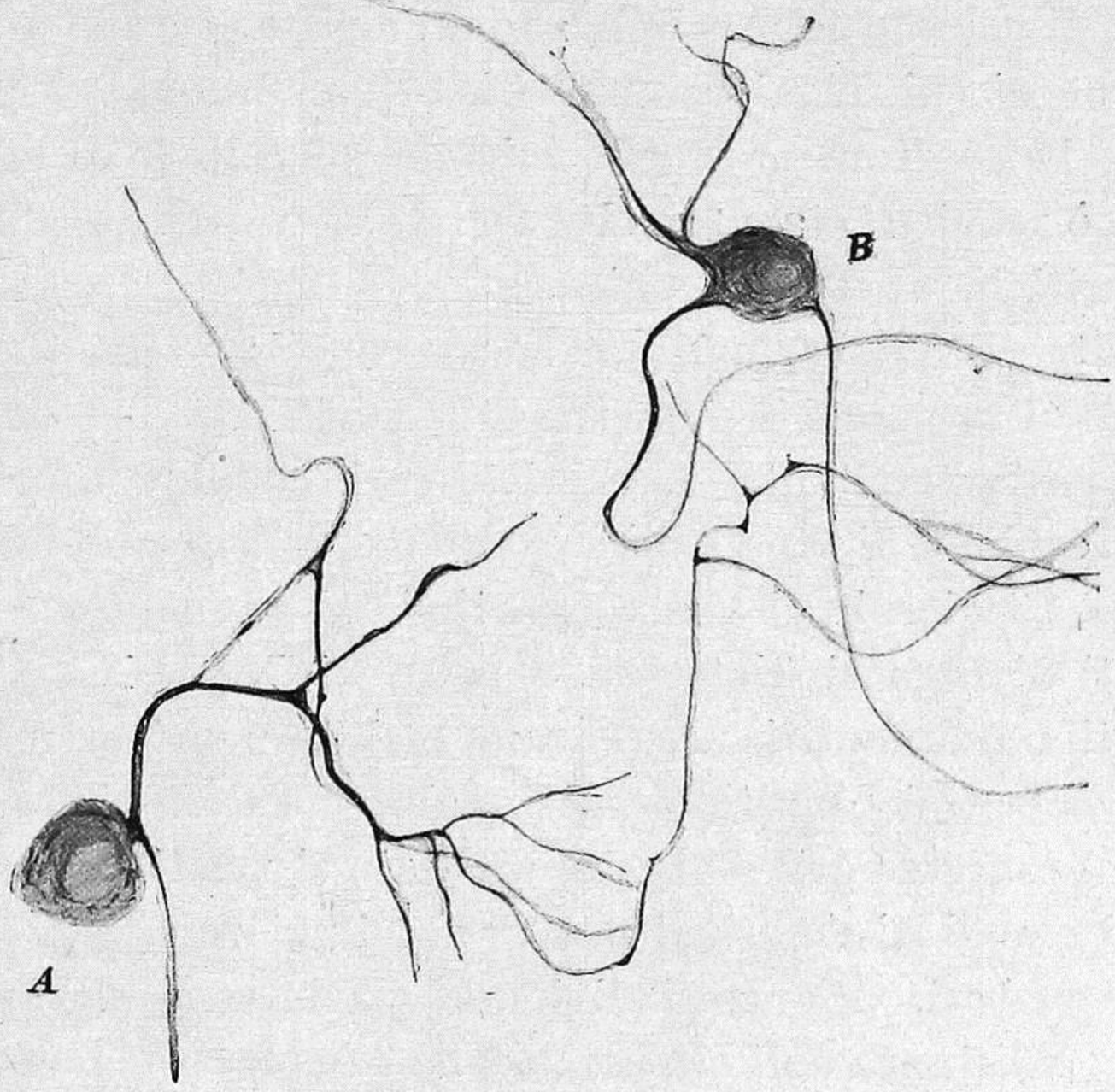

Fig. 7. — Coltura (N. 2196) da un ganglio spinale di embrione di pollo (14° g. d'incubaz.). Nella cellula *A* i 2 neuriti sono in procinto di unirsi in un tronco unico ; uno di questi si divide ripetutamente nell'espianto formando una ricca arborizzazione. La cellula *B* emette 3 neuriti. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 270 ×.

per l'embrione, affusata o sferica (a seconda dello stadio di sviluppo) ed emettono i due neuriti ai poli. L' incremento di volume del pirenoforo può essere pure associato al ravvicinamento ed alla riunione in un tronco unico dei due neuriti opposti.

Però anche il processo di riunione dei due neuriti può avvenire o meno a seconda dei casi ; ad es. nella coltura riprodotta a fig. 3 (da un embrione di 10 giorni) tutti i neuroni sono bipolari. Certamente in colture di embrioni più progrediti, di 13-15 giorni, molte cellule hanno un neurite unico diviso a T.

Il che però non basterebbe a provare che la riunione dei due neuriti in un tronco unico possa avvenire in vitro, perchè nei gangli

di embrioni di 12-15 giorni si vedono molte cellule unipolari con neurite a T ; tale trasformazione si era adunque digià prodotta nel ganglio dell'embrione prima che questo venisse espiantato. Noi siamo convinti, che come già ESAKI aveva notato, la riunione dei due neuriti in un tronco unico possa prodursi in vitro, ma di rado ed in cellule singole. Sembra vi sia relazione fra questo processo e l'aumento di volume della cellula ; ad es. nella coltura di un embrione al 3° giorno di cui fu fatto cenno (fig. 1), nella quale l' incremento di volume in confronto a quello iniziale (piccolissimo) era considerevole, si è manifestata in molte cellule la tendenza alla riunione dei 2 neuriti in un tronco unico.

In molte cellule, le quali pur conservano la forma tipica, si formano neuriti accessori in numero vario. Digià ESAKI accennò fugacemente a questa possibilità. Io ho visto varie cellule con molti neuriti in tutti gli espianti di gangli, più sovente in quelli di embrioni più inoltrati di 14-15 giorni. Si vedono partirsi dal pirenoforo 3-4 ed anche più neuriti divergenti (figg. 4, 7, 8, 9, Tav. XXXII-XXXIII, fig. *c*).

Il destino dei neuriti, provengano essi da neuroni tipici bipolari o da neuroni atipici multipolari, è analogo. Talora rimangono indivisi sino al margine dell'espianto, e questo si verifica più sovente in colture di gangli di embrioni dal 7° al 10° giorno (figg. 3-5), che in quelli più maturi. Oppure si dividono già in seno all'espianto, talora a breve distanza dall'origine, a T od a V. oppure in ciuffi di rami (figg 6, 7, 9, Tav. XXXII-XXXIII, fig. *c*). Si vedono anche neuriti i quali in seno all'espianto conservano la propria individualità, ma danno collaterali (fig. 7). I rami di divisione dei neuriti e le collaterali hanno, come i neuriti principali, decorso quanto mai irregolare ; essi arrivano al plasma dopo aver descritte ampie curve (fig. 7).

Ed i rami di divisione si suddividono ripetutamente alla lor volta (fig. 6, 7, 9). Cosicchè già al margine del coagulo le fibre che crescono in seno a questo sono incomparabilmente più numerose delle cellule. Inoltre in alcune cellule di gangli di 14-15 giorni ho visto, come MOSSA, cellule con molti brevi prolungamenti con rigonfiamenti terminali (fig. 10), imagini simili alle fibre con clava terminale (parafiti) costanti nei gangli sensitivi e simpatici di animali di gran mole.

Del destino delle fibre nel coagulo ci occuperemo più oltre.

Risulta adunque che per degli stimoli abnormi si esplicano nei gangli espiantati, molti neuroni reagiscono con un'attività formativa

esuberante ; senza che per questo muti la forma tipica, emettono un numero maggiore di neuriti, di quel che sarebbe avvenuto nello sviluppo normale e questi si ramificano ; altri neuroni reagiscono coll'emissione di parafiti, formazioni che non si formano in nessun caso nello sviluppo delle cellule gangliari di embrione di pollo. In nessun caso i neuriti si anastomizzano in seno all'espianto.

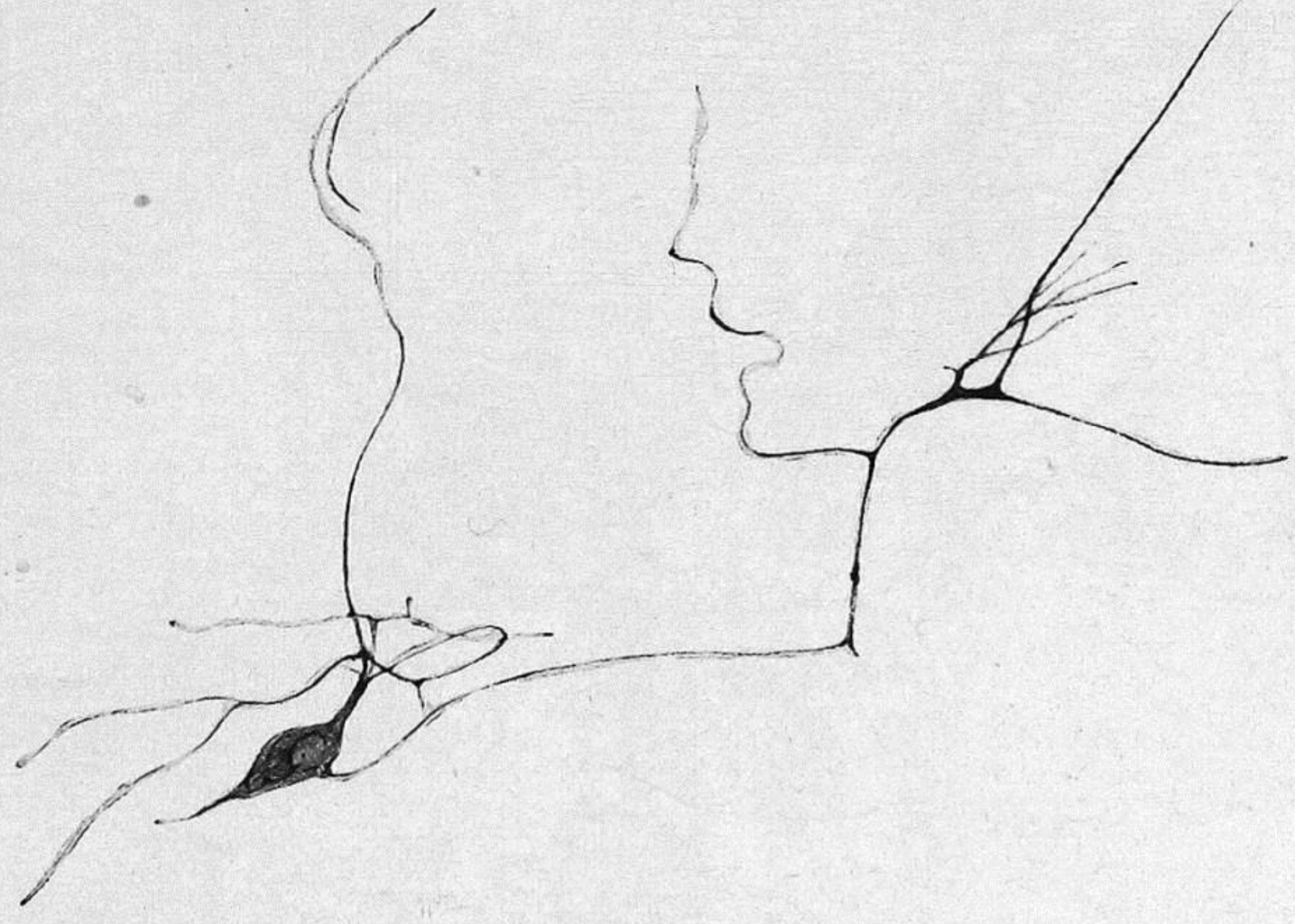

Fig. 8. — Dalla stessa coltura riprodotta nella fig. 7. Cellula presso il margine dell'espianto con 3 neuriti, due di questi, cresciuti nel plasma, si ramificano. Ingr. 165 ×.

Condizioni le quali determinano la dissociazione degli elementi dell'espianto originario. In quest'assottigliamento spontaneo, il quale, conviene accentuarlo, si produce soltanto in casi singoli, senza che ci sia stato però concesso di precisare quali siano le condizioni che lo favoriscono, ha una certa parte la retrazione del coagulo, ma dipende principalmente da una migrazione attiva delle cellule del frammento espiantato, per cui esse si dissociano. Migrazione che è di gran lunga più circoscritta di quella che si produce da parte degli elementi migrati nel coagulo, perchè evidentemente in seno al frammento originario, l'adesione fra le cellule (elementi nervosi ed amficiti) e, negli espianti più maturi, lo stroma mesenchimale che si va formando, ne limita i movimenti.

Lo scorrimento delle cellule è ben manifesto nelle cinematografie di colture. Si vede in tutto l'espianto originario un continuo e vivace brulichio, il quale ad un esame più attento, nei limiti con-

cessi all'osservazione dallo spessore dell'espianto, si palesa dipendente da movimenti diretti in vario senso da parte delle cellule e probabilmente anche dei neuriti. Si direbbe che le cellule si spostino di con-

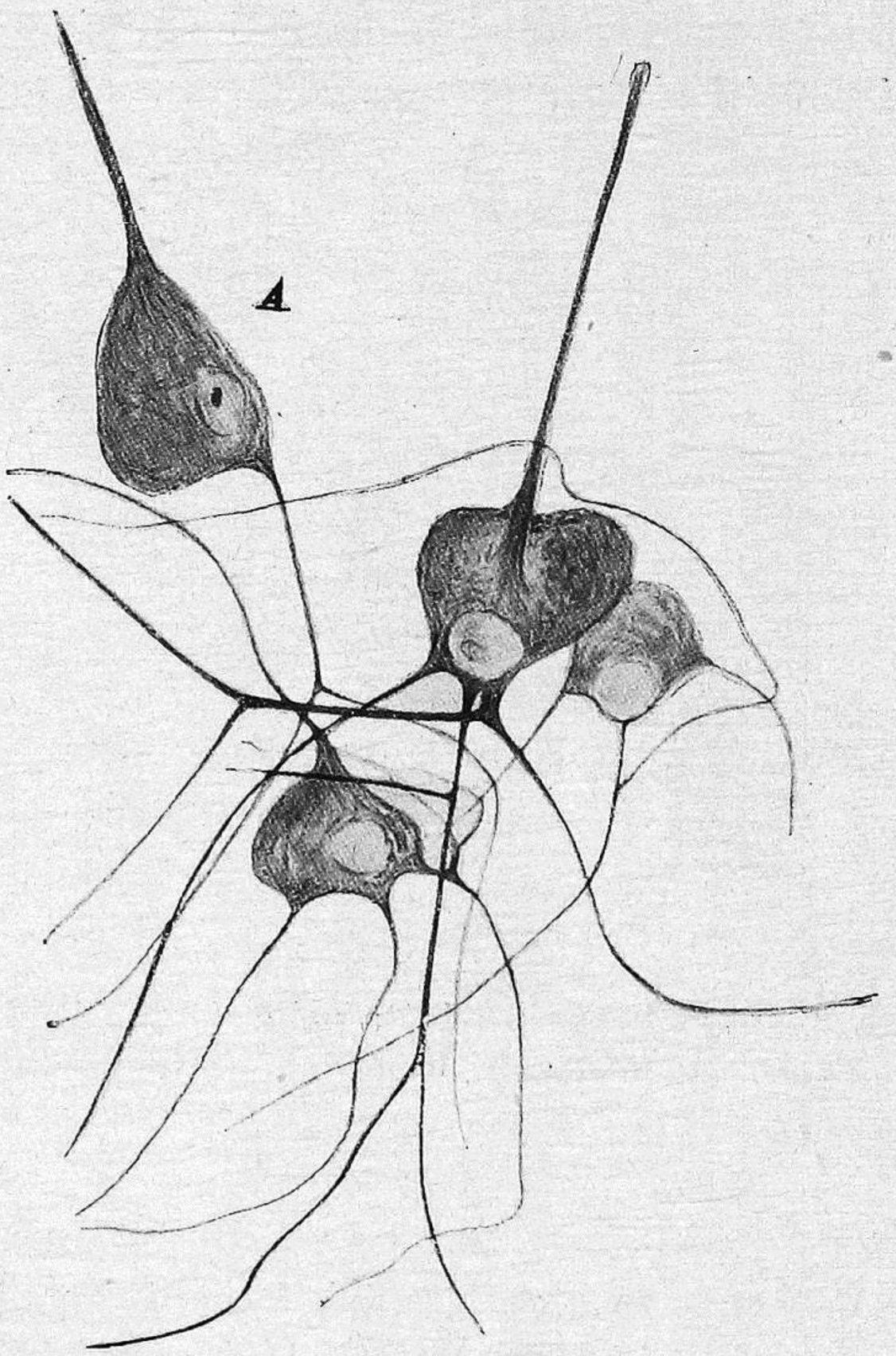

Fig. 9. — Coltura (N. 2328) da un ganglio di trigemello (embrione pollo 15 g.); migrazione attiva delle cellule nell'espianto; cellula *A* con 2 neuriti ai poli opposti, uno di questi si biforca; tutte le altre cellule con neuriti multipli, alcuni si dividono. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 415 ×.

tinuo senza orientazione ben definita; però, seguendo per qualche tempo la cinematografia, risulterebbe che le cellule periferiche si dirigano verso il margine più vicino dell'espianto, le più centrali in senso opposto. Integrando quanto si vede nelle cinematografie coi risultati dell'esame dei preparati colorati col metodo Cajal, riteniamo di poter così ricostruire la serie dei fenomeni, per cui le cellule che nell'espianto erano sovrapposte in vari piani, si disco-

stano e finiscono col diporsi in un unico piano. Vi ha una certa parte la migrazione delle cellule del ganglio che non hanno i caratteri specifici di cellule nervose: *a*) cellule dello stroma del ganglio, (mesenchimali); *b*) cellule satelliti dei pirenofori e delle fibre nervose (amficiti e lemnoblasti) derivate dall'abbozzo del ganglio; *c*) cellule

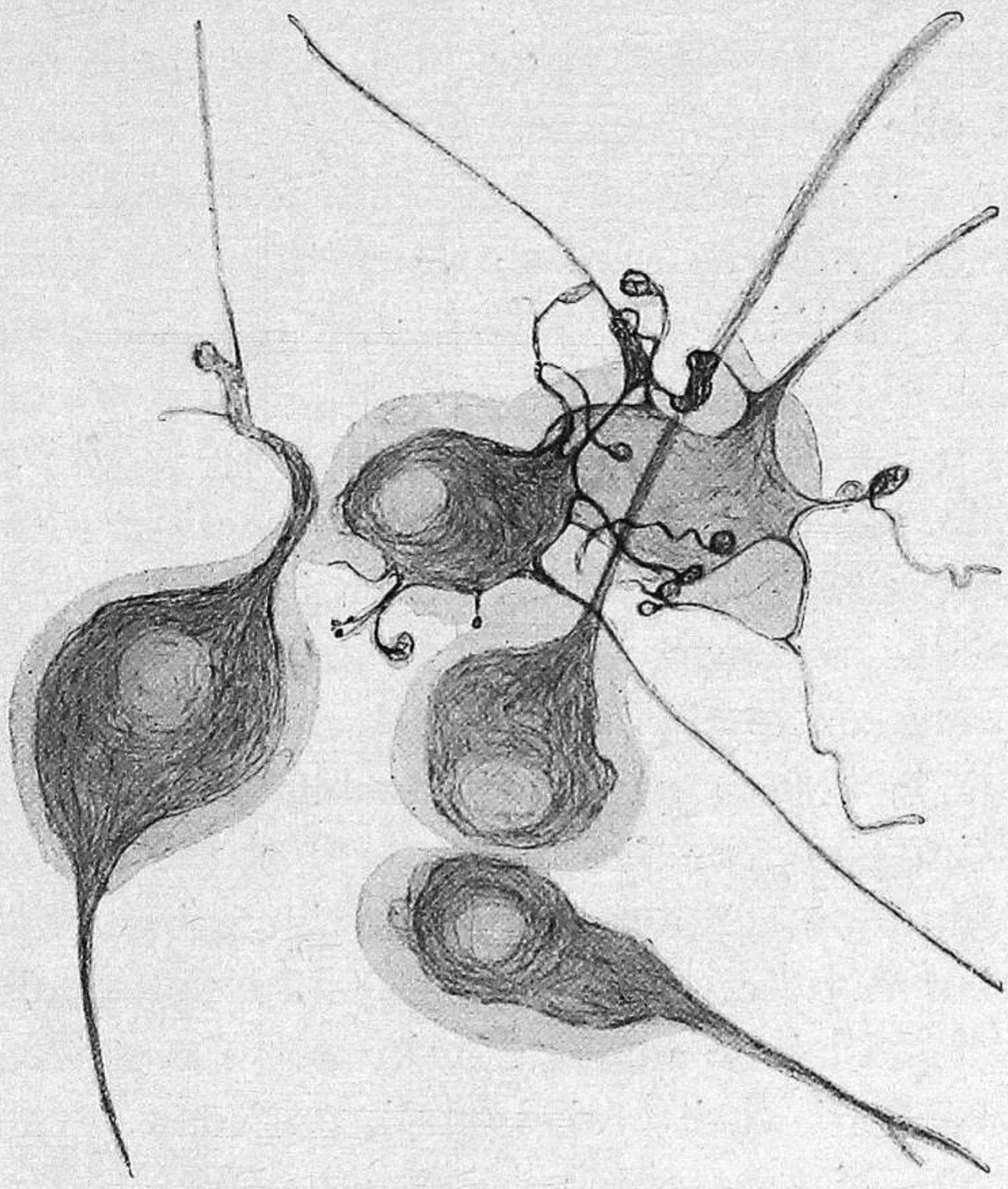

Fig. 10. — Dalla stessa coltura riprodotta a fig. 9. Cellule con brevi prolungamenti rigonfi all'estremità (parafiti). Ingr. 475 ×.

indifferenziate destinate a divenir neuroblasti, ma che non hanno ancora formato il neurite e non contengono neppure neurofibrille, e perciò è difficile distinguerle dalle precedenti. Esse sono numerose in embrioni al 7°-8° giorno, più scarse in gangli di embrioni al 10° giorno, infine in quelle di 14-15 giorni non se ne trovano più. Gli amficiti ed i lemnoblasti esistono invece in tutti gli stadi di sviluppo. Sebbene tutti questi elementi non abbiano connessioni materiali colle cellule gangliari, certamente la migrazione di essi dall'espianto verso il coagulo favorisce lo spostamento delle cellule gangliari.

Da quanto abbiamo visto nei vari espianti ci sembra, che il destino di questi elementi che non hanno i caratteri di cellule nervose (cellule indifferenti, amficiti e lemnoblasti) sia variabile; talora

soltanto in parte emigrano nel plasma, in parte regrediscono nell'espianto. Ma in alcune colture nell'espianto originario restano soltanto cellule nervose, tutti gli altri elementi scompaiono (pag. 454, fig. 5, Tav. XXXII-XXXIII, fig. *c*). Però la migrazione degli elementi non nervosi del ganglio non basta a spiegare uno scorrimento di così alto grado delle cellule nervose, com'è quello che si osserva sovente ; bisogna ben ammettere che vi abbiano una certa parte fattori insiti alle cellule nervose stesse.

Per spiegare la migrazione nel coagulo dei neuroblasti di embrioni precoci, OLIVO invocò la trazione esercitata dal neurite in via di accrescimento. Ma l' interpretazione non è applicabile allo spostamento delle cellule gangliari nell'espianto, ove, come abbiamo detto, i neuriti spesso descrivono larghe e complesse volute prima di arrivare al coagulo. Tenendo conto specialmente di quanto si vede nelle cinematografie, riteniamo che la migrazione delle cellule nervose non possa essere soltanto passiva ; sicuramente esse si spostano attivamente, ma con quale meccanismo ciò avvenga non si può precisare. Finchè le cellule gangliari rimangono nell'espianto non si vede alcuna imagine che faccia pensare a movimento ameboide. Si debbono adunque supporre che i movimenti ameboidi siano così lievi, che essi non determinano alcun mutamento nella forma della cellula. Una supposizione analoga fu invocata a spiegare la migrazione dei fibroblasti fusiformi, i quali, pur conservando invariata la propria forma, si spostano velocemente (LEVI 1919).

CARATTERI DELLA ZONA DI ACCRESCIMENTO NELLE COLTURE DI GANGLI SENSITIVI.

Accrescimento di fibre nervose libere.

Nelle ricerche antecedenti sugli espianti di tessuto nervoso si trascurò quasi sempre di rintracciare l'origine dei neuriti cresciuti nel coagulo, perchè nelle colture di encefalo e midollo ciò di solito riesce praticamente impossibile. Si vede l'espianto originario circondato da una selva di fibre nervose, che, sebbene abbiano carattere uniforme, sono il prodotto di differenziazione di cellule di vario

tipo. Inoltre le fibre cresciute nel coagulo non hanno tutte lo stesso valore ; noi sappiamo che alcune di esse si sono differenziate in vitro, altre sono rigenerate.

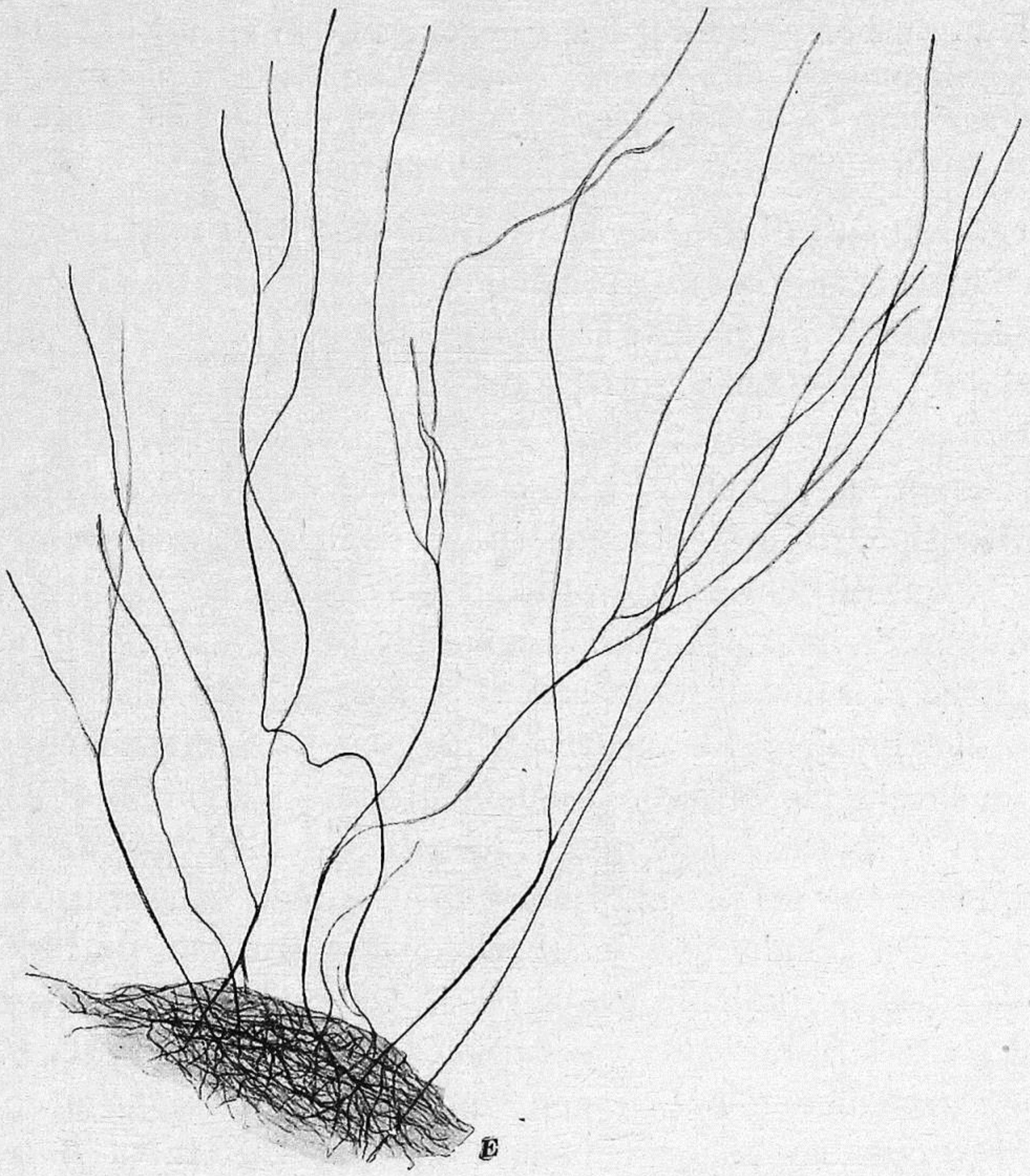

Fig. 11. — Coltura (N. 2329) da un ganglio del trigemello di un embrione di pollo (15° g. incubaz.); grosse fibre cresciute dall'espianto *E* nel plasma, ove si ramificano. Negli intervalli fra le grosse fibre reti di fibre estremamente sottili originate dalle prime ; non furono riprodotte perchè inapprezzabili all' ingrandimento col quale la figura fu disegnata (vedi fig. 18). Ingr. 170 ×.

Olivo ha cercato di indagare con molto acume quali fra le fibre cresciute nel plasma si sono sviluppate in vitro da elementi indifferenti e quali sono rigenerate.

Sebbene le une non si distinguano dalle altre per caratteri morfologici, fondandosi sovra argomenti d' indole indiretta, l'A. ritenne che non tutte le fibre mutilate rigenerino in vitro, e che il numero delle fibre che crescono

nel plasma raggiunga un massimo negli espianti di embrioni al 6°-7° giorno, nei quali il processo di differenziazione del tessuto nervoso è in piena attività. L'A. ne deduce che rigenerano a prevalenza le fibre di quei neuroblasti che si sono differenziati più di recente. Secondo l'A. nelle colture sono da ritenere come rigenerate quelle fibre che crescono nel plasma durante le prime ore, più tardi si aggiungono ad esse i neuriti di quei neuroblasti che erano già differenziati quando l'espianto fu allestito, ma non hanno raggiunto l'orlo dell'espianto, come pure quelli che si erano differenziati in vitro.

Negli espianti di gangli sensitivi, nei quali per migrazione attiva delle cellule nervose la struttura dell'espianto originario diviene visibile al microscopio (pag. 452 e seg.), è possibile di seguire il tragitto dei neuriti dal tessuto nel plasma, e questi espianti si prestano adunque singolarmente per rintracciare l'origine dei neuriti della zona di accrescimento ; e l'essere i gangli sensitivi costituiti da neuroni di un unico tipo, rappresenta pure una condizione favorevole. Dimodochè in questo materiale è possibile di dimostrare obiettivamente, anzichè per via indiretta, come negli espianti di encefalo e di midollo, quali fibre si sono differenziate in vitro e quali sono rigenerate.

La distribuzione dei neuriti nella zona di accrescimento varia molto nelle singole colture. In quelle ottenute da gangli di embrioni dal 12° al 15° giorno, nelle quali i neuriti sono in prevalenza robusti, questi decorrono nel plasma isolati, mentre nelle colture di embrioni più precoci (7-10 giorni d' incubazione) i neuriti son più esili e decorrono sovente riuniti in grossi fasci. Nelle une e nelle altre i neuriti di solito si ramificano ripetutamente (figg. 7, 8, 11, 12, 17, 18). Vi sono però alcune colture nelle quali essi si dividono poco e singole fibre possono anche rimanere indivise per tutto il tragitto.

Colpisce la sproporzione numerica fra neuriti, nelle regioni della coltura ove questi sono liberi, e cellule, a favore dei primi, il che dipende in gran parte dalle molteplici divisioni dei neuriti, già in seno all'espianto originario, (pag. 458) e più oltre nel plasma.

La divisione dei neuriti nel plasma avviene con modalità varie, divisione a V, e ad angolo acutissimo, o suddivisioni molteplici in uno stesso punto ; i rami prevenienti dalla divisione del neurite possono essere di spessore eguale o diverso (fig. 8).

E sovente una fibra fornisce collaterali più sottili della fibra principale.

Alla sproporzione numerica fra cellule dell'espianto e neuriti della zona di accrescimento contribuisce pure in non lieve misura

la formazione di neuriti accessori emessi direttamente dal pirenoforo, (pag. 458), i quali alla lor volta si suddividono già nell'espianto e più oltre nel plasma (figg. 6, 7, 9).

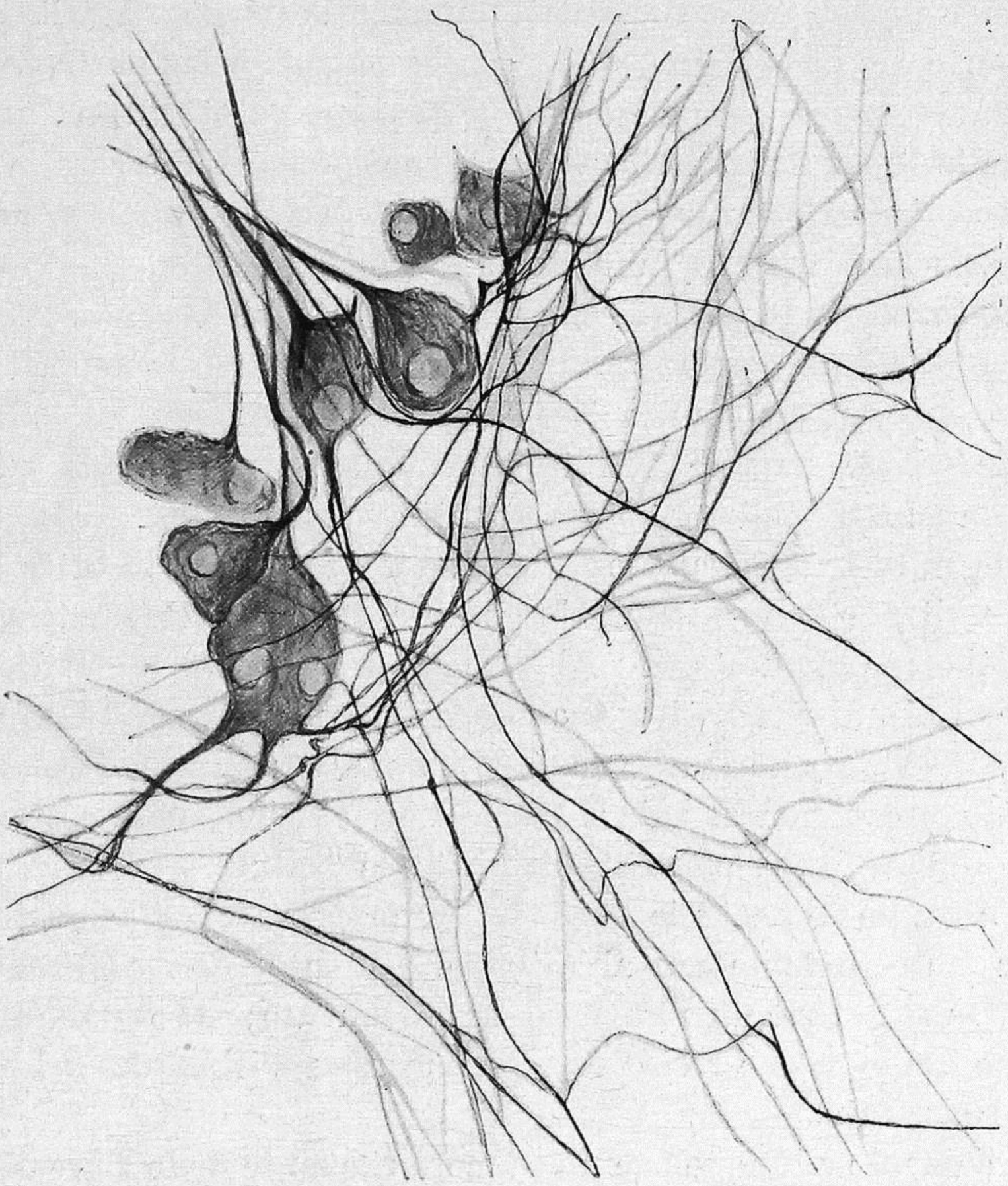

Fig. 12. — Dalla stessa coltura riprodotta a fig. 11, al margine dell'espianto. Cellule con neuriti multipli ; questi danno nella zona di accrescimento collaterali sottili, anastomizzate in qualche punto fra loro. Ingr. 450 ×.

Le fibre cresciute nel plasma soltanto in minima parte derivano da neuroni che si sono differenziati in vitro, e se mai ciò è ammissibile per gangli di embrioni sino all' 8° giorno, nei quali vi sono ancora molte cellule indifferenziate. Nei gangli dal 10° giorno in poi il numero delle cellule indifferenziate è in quantità trascurabile, ed al 14°-15° giorno non ve ne sono certamente più. Le suddette fibre provengono tutte o quasi, a seconda dello stadio, da neuroni già differenziati all'atto in cui furono espiantati. I due neuriti ed i

rami di biforcazione dell'unico neurite che origina dal pirenoforo (negli espianti di embrioni più inoltrati) in parte erano già entrati a far parte del tratto prossimale e rispettivamente distale della radice, e perciò furono mutilati quando l'espianto fu ritagliato; una parte dei neuriti non erano ancora entrati a far parte della radice e crescevano ancora in seno al ganglio; questi ultimi, dopochè il ganglio fu separato dall'embrione, continuano a crescere in vitro, ma con orientazione diversa da quella che avrebbero avuto nell'embrione. In parte per la migrazione attiva delle cellule nervose dell'espianto, in parte per gli stimoli ai quali in vitro sono sottoposti, anzichè orientarsi verso la radice, si portano verso la superficie del ganglio, poi nel plasma; inoltre essi si ramificano, danno collaterali e dalle cellule sorgono neuriti accessori, che si dirigono pur essi verso la superficie del ganglio, attratti verisimilmente verso il plasma da influenze chemiotropiche. È noto infatti che in tutte le colture in vitro, e non soltanto di tessuto nervoso, gli elementi viventi, si tratti come in questo caso di fibre oppure si tratti di cellule, come nelle colture di connettivo di cuore, di epiteli ecc., sono sempre attratti verso la periferia, ove essi trovano un mezzo fresco (BURROWS); in altro modo non si spiegherebbe l'orientazione così costante in senso radiale degli elementi di tutte le colture.

D'altra parte anche le fibre che erano entrate a far parte della radice antecedentemente all'atto dell'espianto, e che furono mutilate, manifestano un rigoglioso accrescimento; esse danno collaterali e dal moncone reciso di ciascuna fibra s'irradiano nel plasma fibre rigenerate.

È evidente adunque che un numero rilevante delle fibre che crescono nel plasma, non sono il risultato di un processo di accrescimento paragonabile a quello dell'embrione, ma derivano da fibre che furono mutilate e si sono rigenerate in vitro.

Ora noi ci siamo posta la questione se le fibre rigenerate hanno caratteri morfologici propri per cui possano essere distinte dalle altre. Secondo MOSSA tali differenze esistono: le fibre rigenerate crescerebbero sempre indipendenti, mentre le altre si anastomizzano a rete. Ciò però non risultò confermato dalle nostre ricerche.

In alcuni gangli di pollo e di uomo furono conservati i due monconi centrale e periferico della radice sensitiva spinale.

Si ottenne un rigoglioso accrescimento di neuriti e questi non si dipartivano soltanto dal contorno del ganglio, ma anche dai mar-

gini delle radici e dal moncone reciso di questi. Fra queste segnaleremo la coltura (da un ganglio di embrione al 10° giorno) riprodotta a fig. *b* (Tav. XXXII-XXXIII), nella quale avvenne la migrazione attiva delle cellule dell'espianto ; si vedono moltissimi neuriti che dalle cellule dell'espianto, dopo aver descritto larghe volute, oltre-

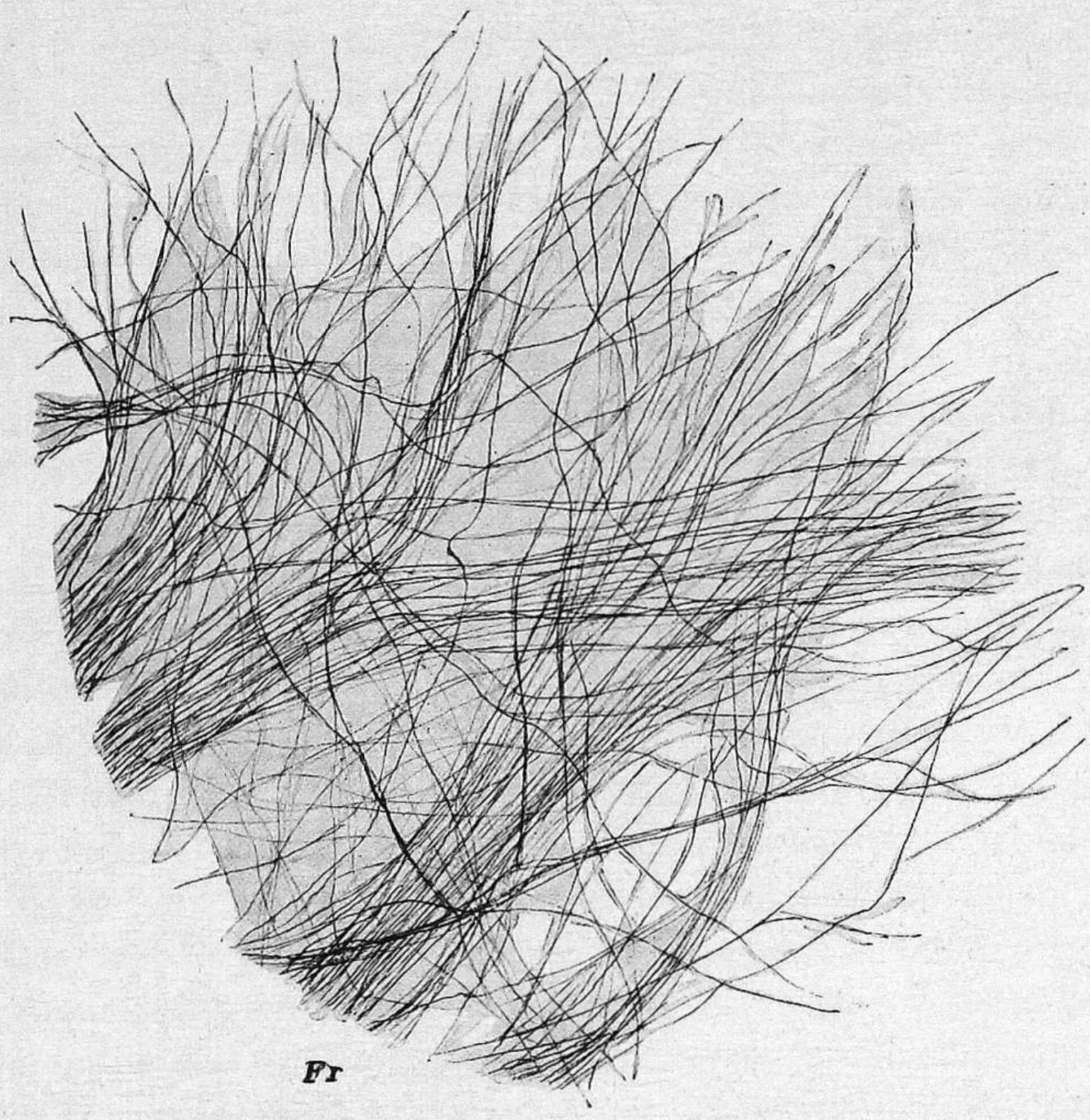

Fig. 13. — La stessa coltura riprodotta a fig. *b* (Tav. XXXII-XXXIII) ed a fig. 5. Fibre rigenerate dalla superficie di sezione della radice, *Fr*. Ingr. 165 ×.

passando il contorno del ganglio, si portano nel plasma ; altri che si seguono nella radice, almeno per un certo tratto, oltrepassano il margine di questa e crescono nel plasma.

Nel punto poi in cui la radice fu recisa, si vedono irradiarsi nel plasma moltissime fibre evidentemente rigenerate (Tav. XXXII-XXXIII, fig. *b*, *Fr*.) e qualche cellula mesenchimale appiattita. Il limite fra fibre vecchie e rigenerate non è invero indicato da un differente aspetto delle singole fibre, ma è facilmente riconoscibile,

perchè la radice costituita da fasci compatti, abbastanza bruscamente si dissocia in fibre lasse, divergenti a ventaglio nel plasma, le quali si ramificano in modo analogo a quelle che crescono direttamente dal ganglio (fig. 13). Infine veruna differenza esiste fra le une e le altre, nè nella struttura, nè nel modo di distribuirsi, nè nei rapporti di interdipendenza vicendevoli.

Anche in colture di gangli di feto umano abbiamo visto ciuffi di fibre dipartirsi dalle superfici di sezione della radice, le quali, in vista della distanza notevole che intercedeva fra questa e le cellule di origine, erano certamente rigenerate.

Spesso queste fibre sono indipendenti: ma in molte colture di embrione di pollo e di uomo si vedono fibre rigenerate anastomizzate fra di loro; mentre d'altro canto molte fibre cresciute dal contorno del ganglio e che, per le ragioni che ho spiegato, non sono da interpretarsi come rigenerate, crescono libere. Il reperto di Mossa sull' assenza di anastomosi fra le fibre rigenerate non può essere adunque generalizzato.

Riassumendo, riteniamo dimostrato, che i neuriti cresciuti nel plasma da espianti di gangli sensitivi maturi, e vi si ramificano, quali son quelli che furono principalmente studiati da noi, derivano tutti o quasi dalle cellule già differenziate al momento in cui il ganglio fu isolato dall'embrione; una gran parte di essi provengono da cellule, i neuriti delle quali crescevano in seno al ganglio e non erano adunque entrati a far parte della radice e differiscono da quelle che si formano nell'ontogenesi normale solamente per il decorso diverso, altri sono neuriti accessori, che si sono formati dai pirenofori per attività formativa esuberante da parte di questi, altre ancora derivano da neuriti della radice, che furono recisi. Soltanto i primi vanno adunque interpretati come il risultato di un processo di accrescimento pari a quello che sarebbe avvenuto nell'embrione, gli altri sono il risultato di un processo rigenerativo e che non ha riscontro nell' ontogenesi, si sono adunque formati per effetto degli eccitamenti abnormi ai quali i neuroni sono soggetti nella coltura. E per questi eccitamenti anormali i neuriti cresciuti in vitro, tanto quelli che chiameremo tipici che gli atipici, si dividono ripetutamente e forniscono rami collaterali.

Dalla semplice osservazione delle colture viventi e meglio nelle cinematografie appare che il progressivo aumento numerico delle fibre della zona di accrescimento dipende soltanto in parte da suddi-

visione delle vecchie fibre ; nuove fibre crescono nel plasma anche durante il 2°-3° giorno.

Col metodo da noi seguito, dopo il 3° giorno non si ottenne accrescimento di nuove fibre. ESAKI in colture rinnovate col metodo Maximow ha notato la comparsa di nuove fibre anche nei giorni successivi. È difficile di stabilire perchè molte fibre crescono nel plasma con ritardo. Sembra probabile che questi neuriti derivino da neuroni situati nella parte interna del ganglio, mentre quelli che appaiono più precocemente derivano forse da neuroni più periferici. Ma è pure probabile, che alcuni neuroni reagiscano con ritardo agli stimoli i quali si manifestano sovra di essi nel nuovo ambiente.

Modalità di accrescimento dei neuriti.

Le fibre cresciute da espianti di gangli, per lo spessore rilevante sono molto adatte ad un'analisi dei fenomeni ameboidi mediante i quali si accrescono in lunghezza.

Su questi fenomeni ben noti non ci soffermeremo a lungo. Accenneremo soltanto a qualche particolare, che le cinematografie ci hanno concesso di apprezzare. Le nostre ricerche attuali dimostrano anzitutto che, tanto nelle fibre le quali crescono dal moncone reciso della radice, come nelle fibre rimaste integre nell'espianto, l'aumento in lunghezza si ha per movimento ameboide dell'estremo distale o cono di accrescimento (SPEYDEL), nome che non è forse il più appropriato, perchè non in tutte le fibre l'espansione ha forma conica.

Non vi è differenza di sorta fra le une e le altre. Nelle cinematografie si vede che quest'ultimo oscilla di continuo in vario senso. e nuovi filamenti sono emessi e riassimilati. Sebbene i filamenti più sottili, per lo scarso indice di refrazione e per l'estrema tenuità, spesso non impressionino la pellicola, il contorno del rigonfiamento terminale della fibra appare spinoso ; le spine corrispondono al tratto iniziale dei filamenti ed esso muta incessantemente la propria forma ; ad un certo punto si vede sorgere dal rigonfiamento un ramo collaterale, esso ingrossa a poco a poco e finisce col diventare la continuazione della fibra principale. La conclusione alla quale uno di noi era pervenuto anni or sono « .,... l' emissione degli pseudopoli è un tentativo per trovare la via più favorevole al suo accrescimento » (G. LEVI, 1917) viene confermata col metodo cine-

matografico e si dimostra pure che anche l'accrescimento rigenerativo delle fibre dell'embrione di pollo e di uomo avviene allo stesso modo.

Quando la via favorevole è trovata, lo pseudopodo che offre maggiori garanzie di stabilità riceve una più cospicua quantità

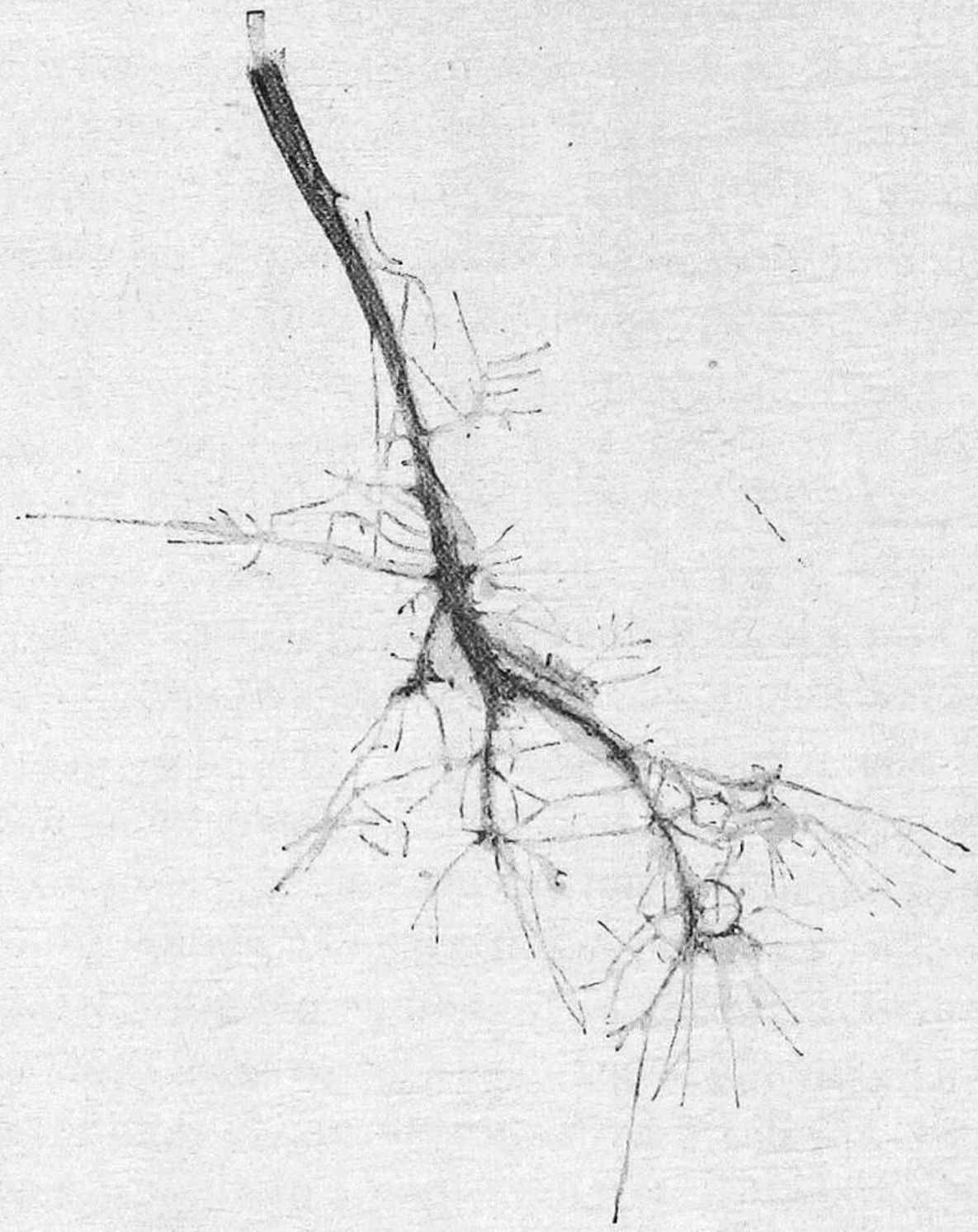

Fig. 14. — Complicata espansione terminale di una grossa fibra (Coltura N. 1671); da un ganglio spinale di embrione di pollo al 5° giorno di incubazione, fissata dopo 16 ore di vita. Lunghi esilissimi filamenti ameboidi. Fiss. Zenker. Ematoss. Held. Ingr. 1600 ×.

di protoplasma dalla fibra principale e perciò s' ingrossa, ed a poco a poco diventa la continuazione della fibra, e contemporaneamente la zona di maggiore attività si sposta verso l'estremo distale.

Le ricerche recenti di SPEYDEL sull'accrescimento e sulla rigenerazione delle fibre nervose nelle larve di Rana viventi dimostrano che l'aspetto generale dei coni di accrescimento delle fibre nervose nelle larve è simile a quello delle fibre che crescono in vitro. SPEYDEL ha visto nelle cinematografie che il cono di accrescimento avanza con un pigro movimento fluente e la fibra nervosa « fila » dietro il cono.

Invece l'accrescimento rigenerativo delle fibre adulte, è pure il risultato di attività ameboide, ma soltanto in parte coincide nei caratteri strutturali con quello descritto nelle fibre embrionali. È superfluo il riferire le ricerche antiche, divenute classiche, di A. PERRONCITO e di CAJAL : sappiamo che dal moncone reciso delle fibre vecchie si partono in numero esuberante fibre sottili, le quali terminano con grosse sfere o clave ; hanno invece analogia colle imagini visibili nelle fibre embrionali i filamenti i quali terminano a ciuffetto. Che una differenza debba esistere fra il comportamento delle fibre embrionali e mature nella rigenerazione, era del resto prevedibile, riflettendo alle proprietà tanto diverse fra le une e le altre.

Nelle cinematografie di colture si conferma inoltre che l'attività ameboide del neurite non si manifesta soltanto coll'emissione di esili filuzzi ; la parte distale della fibra e talora anche tratti lontani dall'espansione terminale, emettono rami collaterali e questi ben tosto diventano robusti e persistono in via definitiva ; però il più sovente ciò non si verifica ; i rami collaterali si accorciano a poco a poco e scompaiono, la loro sostanza viene rapidamente riassimilata dalla fibra principale.

Nelle più grosse fibre l'espansione terminale è estremamente complessa, la fibra si divide in 2-3 rami varicosi, dai quali si dipartono moltissimi filuzzi lunghi ed esilissimi, di esistenza fugace, essi scompaiono e sono sostituiti da nuovi. Alcuni di questi filuzzi collegano fra loro i rami terminali più cospicui (fig. 14), altre volte essi valgono a stabilire anastomosi con fibre vicine (fig. 15). Queste anstomosi sono spesso transitorie, altre volte, quando i filuzzi anastomotici crescono di spessore, diventano definitive. La disposizione a rete fra i filamenti di una stessa espansione terminale, come pure le anastomosi fra fibre contigue mediante finissimi filamenti ameboidi, da noi constatatá durante le ricerche attuali, ci spiega come si possano istituire molto precocemente anastomosi fra i rami collaterali di una stessa fibra, come pure fra fibre contigue ; talora ho visto formarsi colle modalità suaccennate all'estremità terminale di fibre delle reti estese e complesse, dalle quali si dipartivano filamenti liberi, che continuavano a crescere (fig. 16).

Un altro importante particolare attinente l'accrescimento delle fibre si apprezza nelle cinematografie. Nelle più robuste fibre si può distinguere lungo tutto il tragitto di esse un flusso di sostanza, il quale però non è, come si potrebbe supporre, orientato nella direzione dell'accrescimento della fibra, ma presenta un singolare movimento di va e vieni ; il movimento è paragonabile a quello dei gra-

nuli e dei mitocondri nei fibroblasti e nei mioblasti e dipende probabilmente dal medesimo fattore, da una corrente di sostanza fluida,

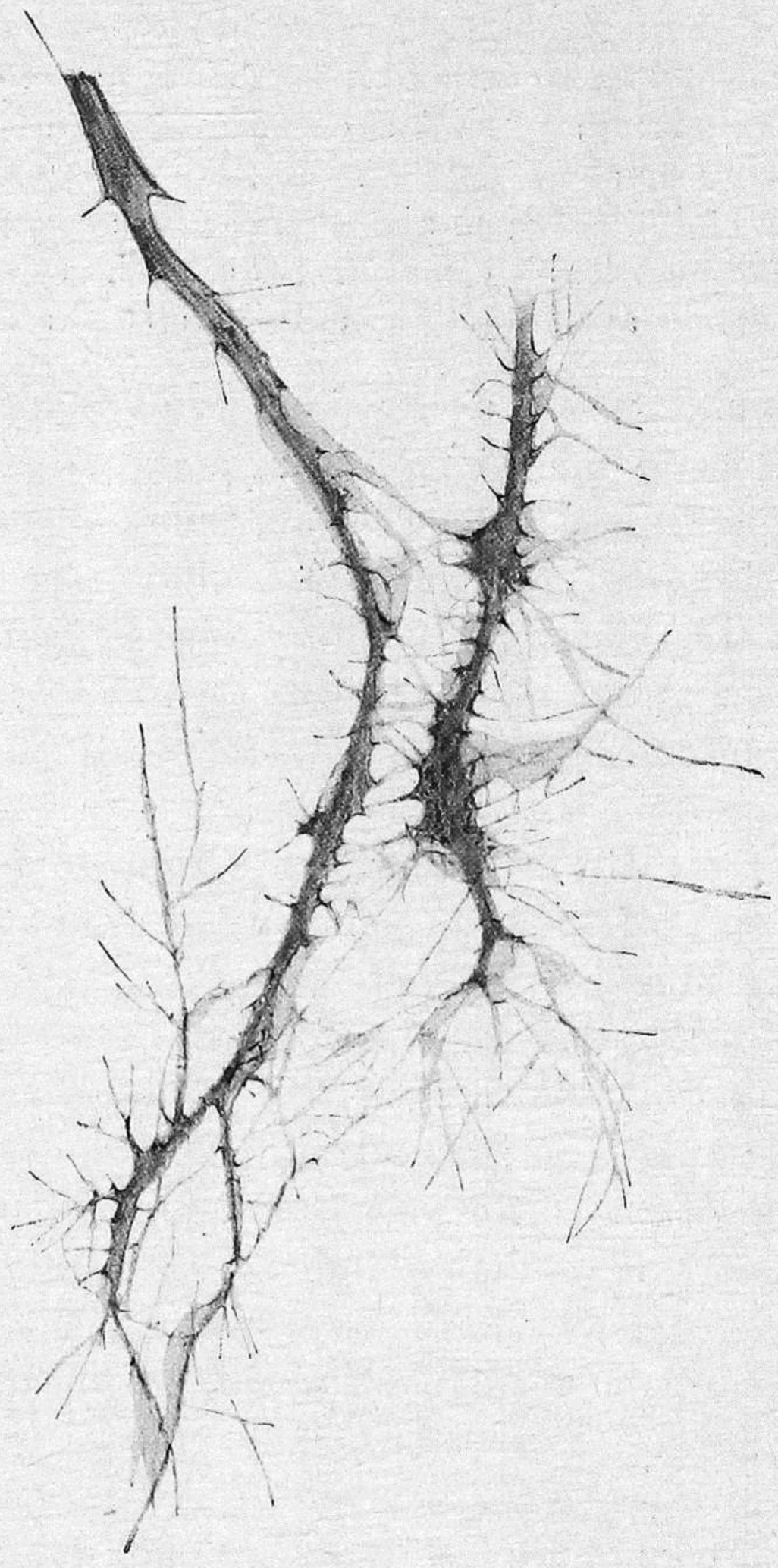

Fig. 15. — Dalla stessa coltura N. 1671 (vedi fig. 14). Espansione di due grosse fibre. Lunghi esili filamenti ameboidi partono dalle due fibre, per un tratto relativamente lungo di queste, numerose anastomosi mediante i filamenti ameboidi. Ingr. 1600 ×.

la quale percorre la fibra in direzioni alterne e trascina con sè le parti sospese. Questo reperto conferma quanto uno di noi aveva notato (Levi 1917), che l'attività della fibra in accrescimento non è circoscritta all'estremo distale, ma che essa si esplica lungo tutto

il tragitto di essa. Nelle colture di gangli i neuriti di regola in un primo tempo crescono nel plasma in direzione centifuga rispetto all'espianto originario ; sappiamo invece che nell'interno dell'espianto tale polarità non si manifesta (pag. 452), le fibre s' intrecciano nelle più varie direzioni descrivendo larghi giri.

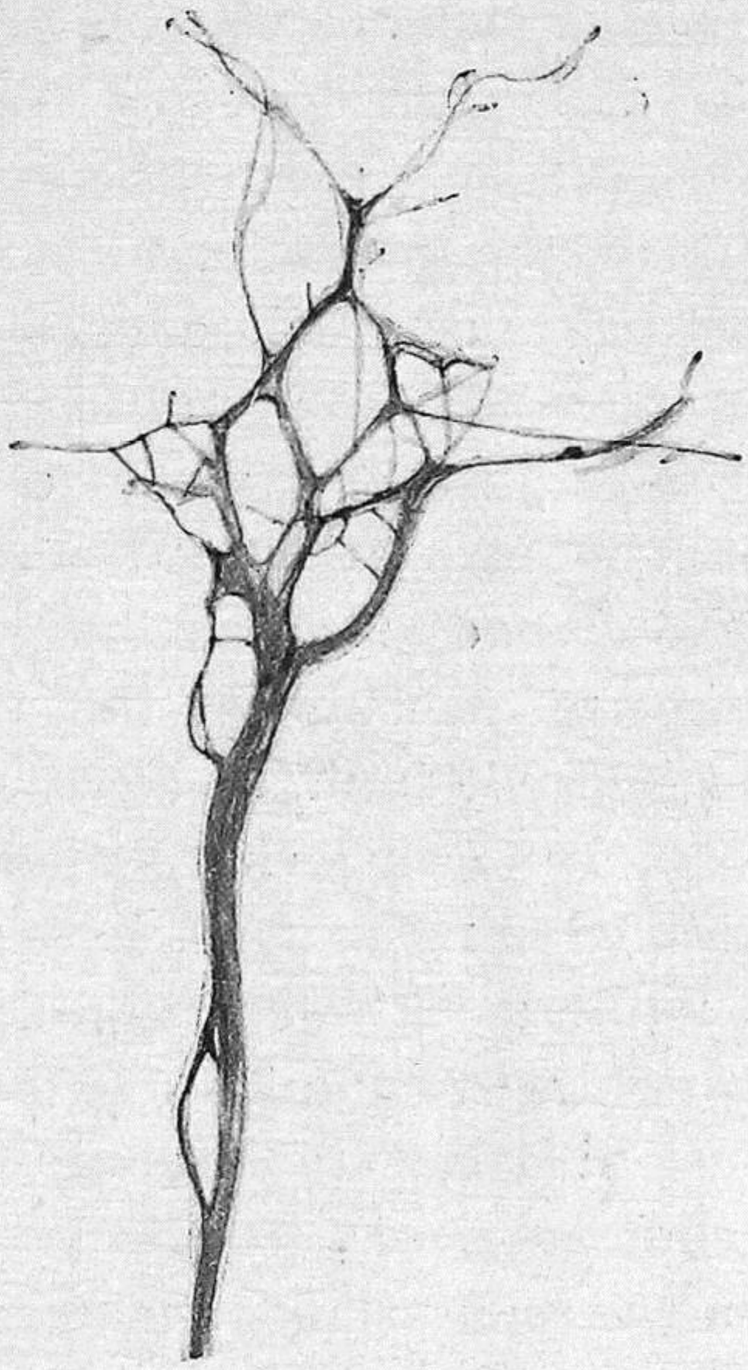

Fig. 16. — Complicata espansione terminale a forma di rete di una grossa fibra. (Da una coltura di ganglio spinale di embrione di pollo, 10° g., fissata alla 24ª ora). Ingr. 750 ×.

Però di rado le fibre nel procedere dall'espianto verso la periferia percorrono la via più breve ; sovente hanno un decorso flessuoso, e questo dipende certamente da ostacoli che l'espansione terminale trova nel proprio cammino (varia densità o spessore del plasma).

Pure a cause meccaniche vanno attribuite, secondo SPEYDEL, i vari aspetti che ha il cono terminale ; un lieve impedimento temporaneo che la fibra trova sul proprio cammino produce un lieve ispessimento od una varicosità ; un impedimento più rilevante determina la formazione di un cono gigantesco, oppure la formazione di rami collaterali.

Ed in presenza di un ostacolo insuperabile il cono scompare e se ne sviluppa uno nuovo, per cui la direzione di accrescimento si modifica.

Quando poi le collaterali fornite dalle fibre più grosse si anastomizzano, il tragitto delle fibre diviene ancor più irregolare ; sebbene l'estremità libera delle fibre in via di accrescimento tenda sempre verso la periferia, questa tendenza viene inibita dalle anastomosi con fibre contigue ; ne deriva un decorso estremamente irregolare delle fibre.

Un'altra condizione ancora determina un mutamento nella direzione dell'accrescimento dei neuriti : le connessioni intime che esse sovente assumono con elementi di natura non nervosa, i quali emigrano tardivamente dall'espianto (pag. 497 e seg.). ESAKI aveva esattamente osservato questo fatto. « The contact between the growth cone and such cell-body is so close that fibres are forced to follow the wandering movements of the cells ; this explains the otherwise incomprehensible form of some nerve fibres for instance the occurence of loops and sharp angles ».

Nei nostri preparati, ed in modo più incisivo nelle cinematografie, abbiamo confermato l' interessante reperto di ESAKI ; dopochè una cellula migrante è arrivata in contatto dell'estremo distale di un neurite, evidentemente si vede stabilire un' intima adesione fra quest'ultima e la cellula (fig. 34), perchè l'estremità del neurite segue la cellula nella sua migrazione, anche se questa avviene in direzione opposta alla direzione di accrescimento del neurite. Così ci spieghiamo il tragitto ricorrente che i neuriti in certi punti assumono (fig. 32).

In qualche rara coltura abbiamo visto alla periferia della zona di migrazione un fascio di fibre orientato parallelamente al contorno dell'espianto ; era costituito dalla riunione di fibre singole, le quali ripiegavano bruscamente e si riunivano in un fascio compatto, oppure in un plesso di fibre. Sembra che vi sia una barriera la quale impedisce l'avanzare delle fibre verso la periferia.

Nella coltura riprodotta a Tav. XXXII-XXXIII, fig. *a* si vede alla periferia della zona di accrescimento un fascio trasversale di neuriti sottili anastomizzato colla fitta rete di fibre contenuta nella parte retrostante della coltura ; i neuriti arrivano sino al fascio trasversale e non più oltre, quasi che vi fosse in quel punto un ostacolo ; le fibre che crescono distalmente al fascio non sono situate

nel plasma, bensì in contatto col vetrino. Questa singolare disposizione ed altre analoghe dipendono certamente da condizioni meccaniche del mezzo, variazioni nella densità e nello spessore del plasma. Nella coltura in questione l'ostacolo è chiaramente segnato dai caratteri microscopici del plasma ; mentre in tutto il rimanente della coltura il coagulo appare omogeneo, nella regione situata distalmente al fascio di fibre trasversali, si vede un grossolano precipitato granuloso.

Tali differenze assai poco conosciute dipendono probabilmente dal modo con cui si produce la coagulazione in regioni limitate dello strato di plasma, dopo l'aggiunta del succo di embrioni.

Il mutamento di direzione delle fibre nervose trova riscontro in imagini analoghe che si vedono in colture di fibroblasti o di mioblasti. Uno di noi sovente ha visto alla periferia di queste colture un mutamento brusco nella direzione dell'accrescimento delle cellule ; si vede una striscia orientata tangenzialmente all'espianto.

Formazione di plessi e di reti di fibre nervose.

Digià Mossa ed Esaki ne avevano data una succinta descrizione nelle colture di gangli.

È evidente che nelle colture di questi organi, per la loro semplice struttura, abbiamo la certezza che le disposizioni a rete, la quale appare nella zona di accrescimento, non preesiste nel tessuto originario, mentre questa certezza non vi è per le colture di encefalo e di midollo.

E sappiamo pure che anche dopo le trasformazioni che il ganglio subisce in vitro i neuriti restano indipendenti in seno all'espianto (pag.458 e seg.) ; soltanto dopochè le fibre sono cresciute nel plasma si anastomizzano. Va premesso che nè le anastomosi fra fibre, nè la disposizione a plesso, sono costanti nelle colture di ganglio. In alcune colture quasi tutte le fibre crescono indipendenti (pag. 464 e seg., fig. 11), oppure si uniscono in singole regioni della coltura.

Secondo Esaki le anastomosi fra i neuriti si hanno più di frequente nel materiale ottenuto da embrioni più giovani.

Interessante è l' imagine riprodotta a fig. 17. Due neuroni dell'espianto originario hanno forma sferica tipica ed un unico neurite ; questo raggiunge la zona di accrescimento e vi forma una com-

plessa arborizzazione di rami che terminano quasi tutti liberamente. Però in punti singoli si vedono anastomosi, tanto fra i rami dello stesso neurone, che fra i rami di neuroni distinti. E neppure le col-

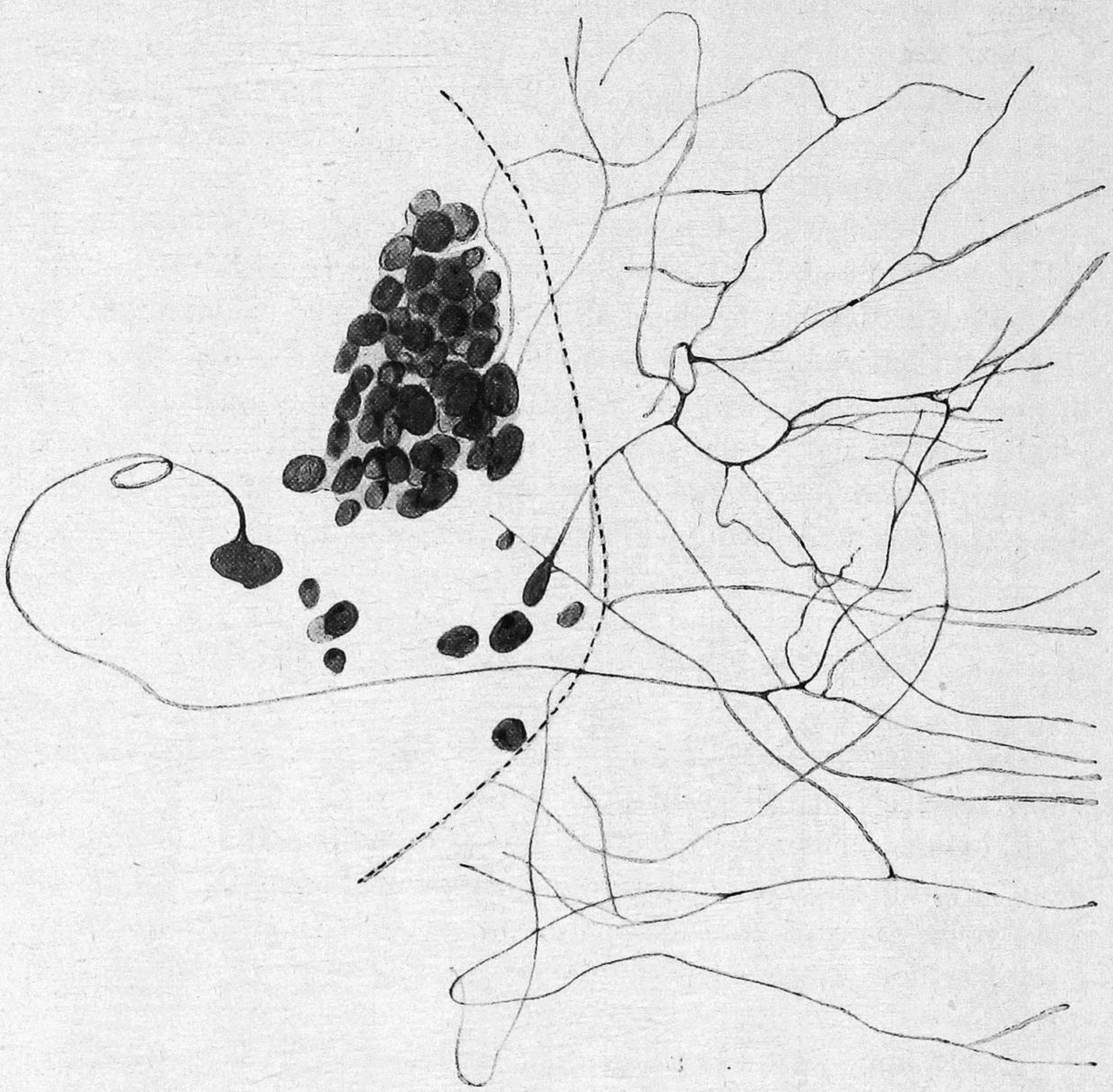

Fig. 17. — Coltura (N. 2196) da un ganglio spinale di embrione di pollo (14° g. d'incubaz.). Parte prossimale della zona di accrescimento ; furono disegnate anche singole cellule dell'espianto. I neuriti che partono da due di queste si dividono soltanto dopo essere arrivati nel plasma. Singole anastomosi nel plasma fra i rami di divisione dei neuriti. (La linea tratteggiante segna il limite dell'espianto originario). Metodo all'argento ridotto. Ingr. 185 ×.

ture a fibre indipendenti hanno sempre gli stessi caratteri ; le fibre crescono isolate, oppure sono riunite in fasci, più di sovente si vedono disposizioni più complesse ; dai fasci principali si separano gruppetti di fibre sottili o fibre singole, e queste si uniscono alla

lor volta a fasci od a fibre contigue, si ha la disposizione detta « a plesso » ; ed in molti casi le connessioni fra le sottili fibre del plesso sono così strette, che è difficile di decidere se mantengono la propria individualità oppure se si anastomizzano.

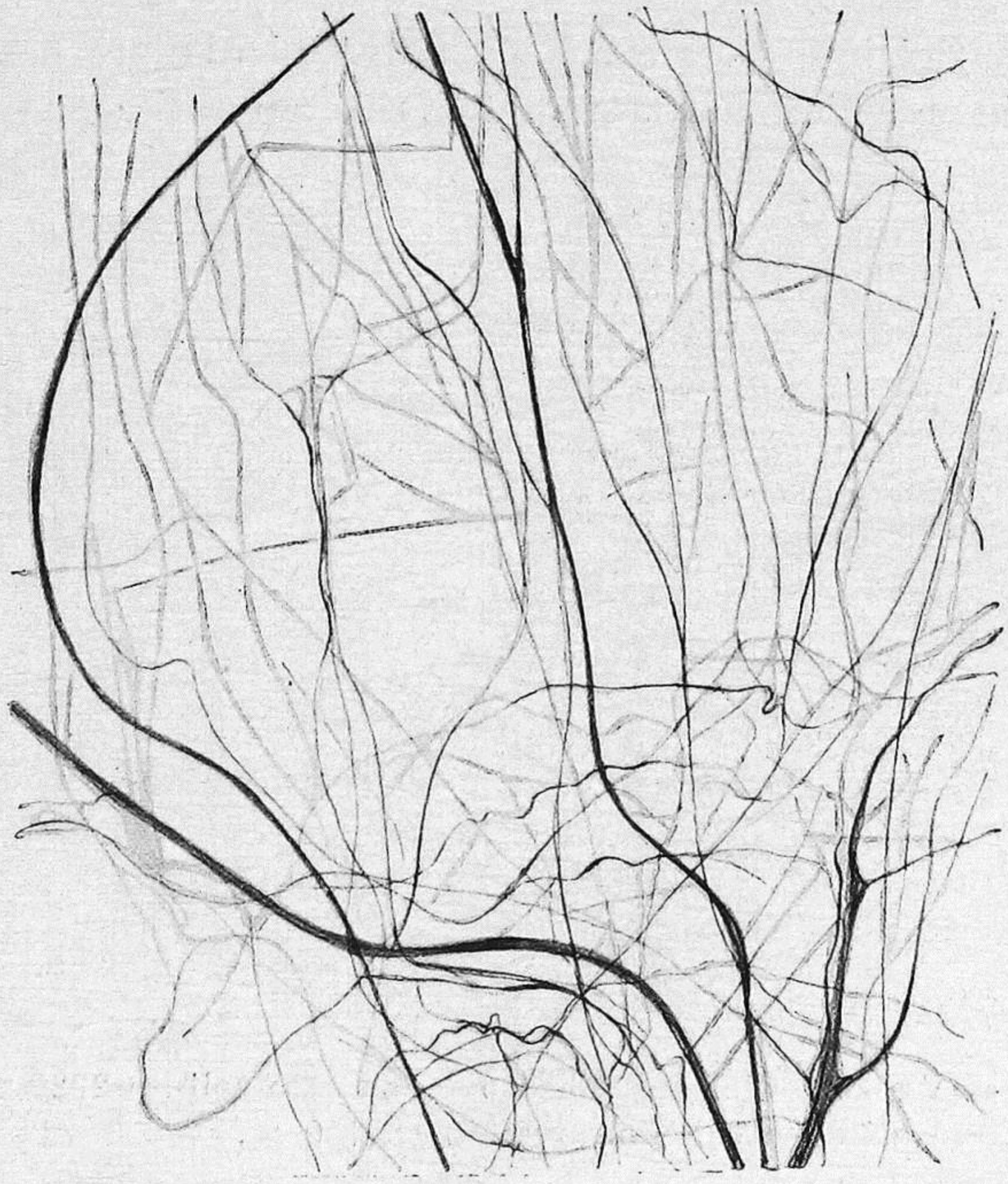

Fig. 18. — Parte prossimale della zona di accrescimento della coltura 2329 riprodottaa fig. 11. Grosse fibre che danno pochi sottili rami collaterali sinuosi, riccamente ramificati ed anastomizzati. Ingr. 600 ×.

Però nella maggioranza delle colture di gangli le anastomosi sono così evidenti, che il dubbio se si tratta di rete o di plesso non ha ragione di essere. E le reti si formano in gangli prelevati da embrioni a vario stadio di sviluppo, dal 5° al 15° giorno. Vi sono differenze nei caratteri della zona di accrescimento di colture ottenute da embrioni precoci ed inoltrati, nelle prime le fibre cresciute dall'espianto sono più robuste ; ma i rapporti di interdipendenza fra le fibre nelle une e nelle altre non differiscono sensibilmente (figg. 12, 17-22, 24, 26, 30, Tav. XXXII-XXXIII *d*, Tav. XXXIV-XXXV *e*, *f*, *g*, *h*, Tav. XXXVI-XXXVII, *l*, *p*).

Risultati specialmente interessanti furono ottenuti dall'esame delle colture viventi e nelle cinematografie. È noto quanto sia difficile di decidere nei preparati fissati se nei punti in cui dei rami nervosi si uniscono, si abbiano vere anastomosi oppure soltanto contatto.

Le imagini interpretate come anastomosi di fibre nervose furono già in periodi antichi sottoposte a rigorosa critica, specialmente

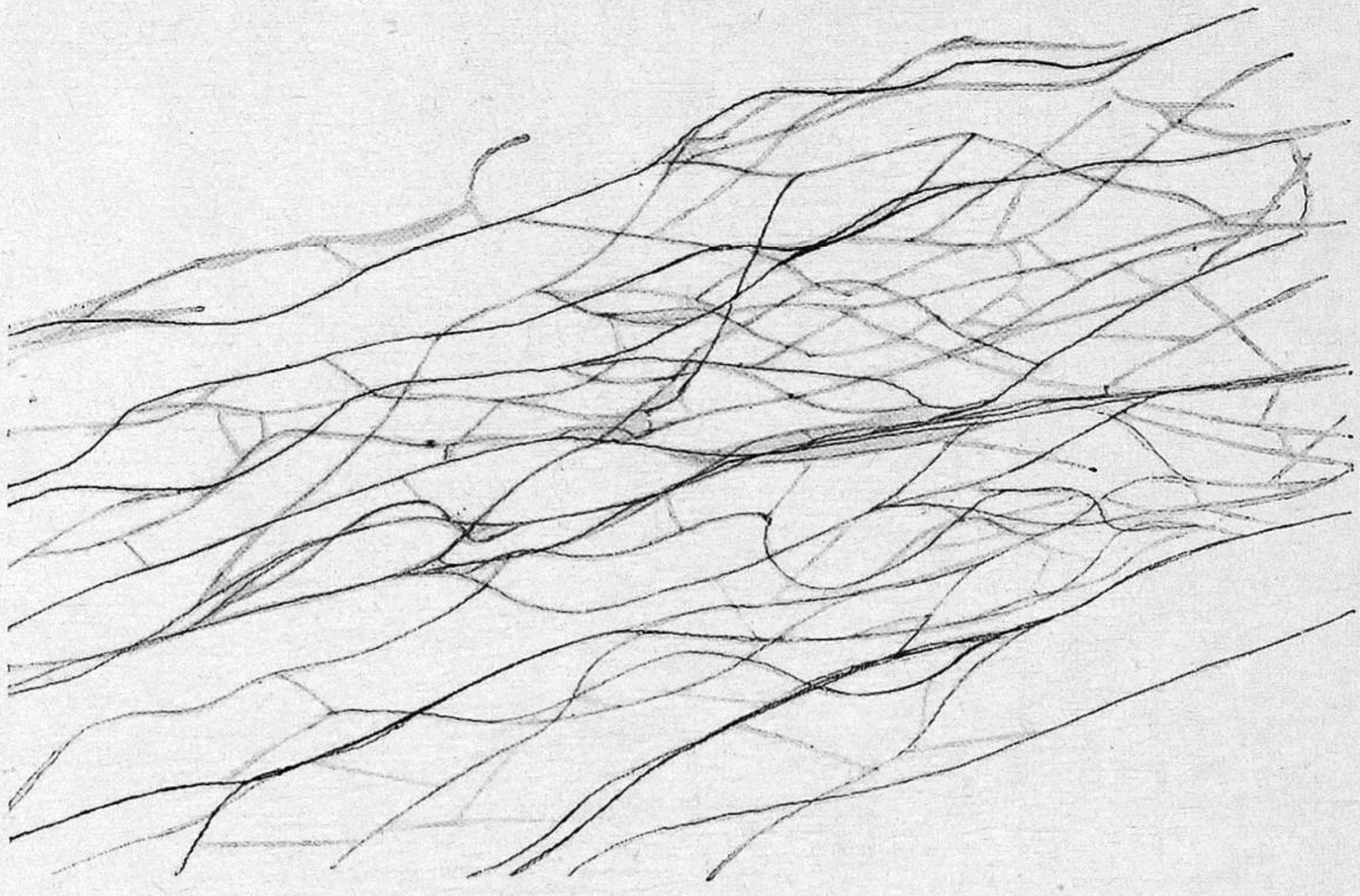

Fig. 19. — Dalla zona di accrescimento della stessa coltura 2329 riprodotta a fig. 18. Reti di sottilissime fibre. Ingr. 750 ×.

ad parte dei fautori della dottrina del neurone. E di recente anche CHAMBERS (Intern. Zellforschung Kongr. in Cambridge, 1933) ha rievocato quest'antica discussione a proposito della comunicazione di SPEYDEL.

Pur riconoscendo la fondatezza di queste considerazioni, riteniamo che col metodo delle colture si sia raggiunta la prova inoppugnabile, che in condizioni determinate si possa avere una continuità materiale nelle anastomosi fra rami nervosi distinti.

Uno di noi aveva dimostrato in passato che nelle arcate anastomotiche, le quali si formano fra fibre cresciute nel plasma, vi può essere continuità di sostanza (LEVI, 1917). Quest'osservazione fu più ampiamente documentata durante le ricerche attuali. Nelle cinematografie si sorprende talvolta l'incontro e la fusione fra le

espansioni di fibre. Si vedono convergere le espansioni terminali di due fibre libere fino ad incontrarsi, ma non si uniscono subito ; le espansioni compiono per qualche tempo lievi oscillazioni in vario senso, quasi procedessero per ripetuti tentativi, finchè si costitui-

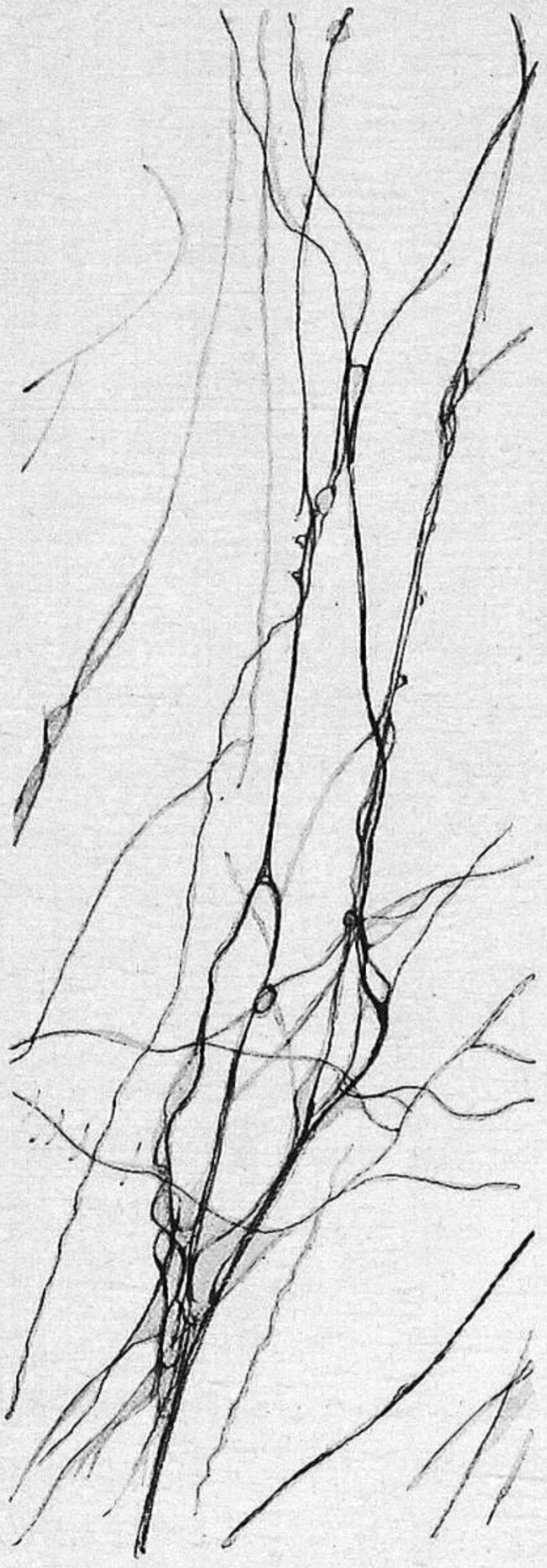

Fig. 20. — Dalla zona di accrescimento della coltura N. 2397 (embrione di pollo di 12 g.). Anastomosi fra fibre a costituzione plessiforme. Metodo all'Argento ridotto. Ingr. 665 ×.

sce un' anastomosi ad arco oppure ad angolo acuto. E talora abbiamo visto un flusso di sostanza attraverso l'arcata anastomotica, il che ci dà la riprova indiscutibile che nel punto di riunione non si ha soltanto contatto, bensì continuità materiale di sostanza. Però le cinematografie confermano quanto LEVI aveva visto che non sempre le anastomosi fra fibre sono definitive ; dopo un certo tempo la

continuità si può interrompere e le fibre continuano a crescere restando indipendenti.

In relazione alla velocità con cui le anastomosi si costituiscono, al numero ed al calibro dei rami anastomotici, i caratteri delle singole colture variano all' infinito. Per accennare alle disposizioni che maggiormente differiscono l' una dall'altra, talora vi sono ampie arcate anastomotiche fra robuste fibre o fra collaterali di queste (figg. 17, 22, Tav. XXXIV-XXXV, figg. *e*, *f*, *h*, *k*, Tav. XXXVI-XXXVII, *l*, *p*). Altre volte vi sono reti a maglie strette a fibre di un certo spessore oppure estremamente sottili ; ed in una stessa coltura ed anche in una singola regione di una coltura si vedono rami anastomotici sottilissimi e robusti (fig. 21, Tav. XXXIV-XXXV, figg. *e*, *h*).

Le fibre più cospicue, le quali conservano una certa individualità crescono nello spessore del coagulo, mentre di regola le sottili fibre che crescono in contatto col vetrino sono anastomizzate a rete ; non sempre però ; molte reti anche esilissime si formano nello spessore del coagulo.

Sono molto istruttive le imagini che abbiamo visto in una coltura di ganglio del trigemello di un embrione di 15 giorni ; dalle voluminose cellule dell'espianto originario crescono robuste fibre ; esse si ramificano nel coagulo senza anastomizzarsi (figg. 11, 18), ma in molti punti si vedono plessi e reti di fibre molto meno cospicue ed in parte sottilissime (figg. 18, 19). In altre colture ottenute da gangli presso a poco allo stesso grado di maturità (fig. 21) si vedono arcate anastomotiche anche fra rami grossi, però queste non sono mai tanto numerose come quelle formate da fibre sottili. Nessun dubbio che i plessi e le reti di fibre più sottili sono forniti da rami collaterali delle fibre più grosse, le quali nella coltura a fig. 18, come in molte altre ottenuti da gangli molto maturi, si dividono ma non si anastomizzano. Questi rami sottili di rado nascono in seno all'espianto originario, quasi sempre dal tratto che le fibre percorrono nel plasma. I suddetti rami collaterali non sono in questa coltura molto numerosi, ma essi si ramificano così riccamente, che tosto formano nella zona di accrescimento plessi e reti di grande complessità (figg. 18, 19).

Sul modo con cui si formano le anastomosi fra le fibre estremamente sottili, non abbiamo elementi di giudizio sicuri ; fummo costretti ad accontentarci di quelli forniti dalle imagini statiche dei preparati colorati

all'argento. Questi filamenti sono talmente tenui che a stento si distinguono nelle culture viventi e non impressionarono la pellicola nelle ricerche da noi intraprese col metodo cinematografico.

Non è da escludere però che con più forti ingrandimenti e con un'illuminazione più intensa sia possibile in avvenire di riprodurre nelle cinematografie le modalità con cui le più tenui collaterali si accrescono e si anastomizzano.

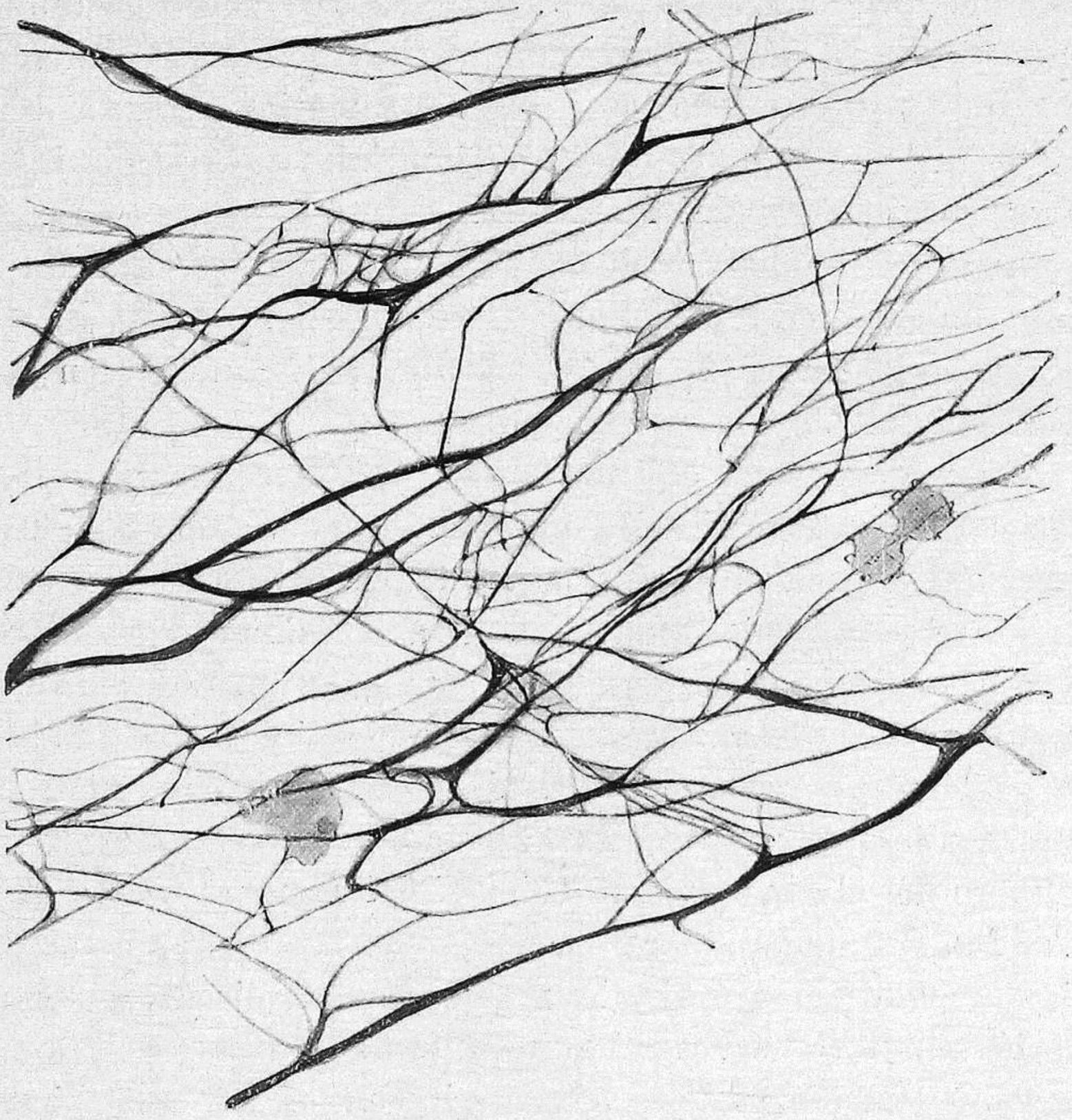

Fig. 21. — Coltura (N. 2200) di g. spinale di embrione di pollo (14° g.). Parte prossimale della zona di accrescimento, complicatissime anastomosi fra grosse fibre mediante sottili rami collaterali. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 475 ×.

In altre colture, e specialmente in quelle di gangli di embrioni dal 7° al 12° giorno, non vi sono fra i vari rami della zona di accrescimento differenze di spessore tanto pronunziate. I rami hanno in queste colture quasi dappertutto disposizione plessiforme, in qualche punto molto complicata; se, come il più spesso accade, le maglie del plesso sono allungate nella direzione dell'accrescimento delle fibre, si istituiscono fra queste anastomosi ad angolo acuto (Tav. XXXII-XXXIII, fig. *d*).

Quando invece i rami provenienti da suddivisione delle fibre divergono molto, le maglie del plesso si estendono in senso tangenziale all'espianto e si vedono arcate anastomotiche fra i rami di una stessa fibra, oppure fra fibre diverse vicine o lontane (Tav. XXXIV-XXXV, figg. *e*, *f*). A seconda del numero dei rami anastomotici si formano reti a maglie larghe e strette. Anche lo spessore dei rami anastomotici contribuisce a conferire alla rete impronta diversa; questo spessore è variabilissimo ; si vedono maglie fornite da grosse fibre ed altre da filamenti estremamente esili; in genere, ma non sempre, queste ultime formano reti più intricate (cfr. figg. *e*, *h* in Tav. XXXIV-XXXV).

Spessissimo poi alla formazione della rete formata da fibre cresciute dall'espianto prendono parte anche i neuriti di cellule migrate nel plasma ed i cordoni fibrillari ; di queste connessioni parleremo più oltre.

E sebbene ciascuna coltura abbia un' impronta propria, per l' entità e per i caratteri delle anastomosi, si vedono anche nelle varie regioni di una stessa coltura imagini diverse.

La parte prossimale della zona di accrescimento ha di regola caratteri diversi quantitativamente e qualitativamente dalla distale. In quest'ultima le fibre sono meno fitte e le reti a maglie più larghe, presso l'espianto si vedono plessi più complicati, cordoni fibrillari e reti a maglie strette. Al limite estremo della coltura le fibre crescono libere nel plasma (Tav. XXXII-XXXIII, fig. *d*, Tav. XXXIV-XXXV, fig. *f*).

Riassumendo quanto si rileva sui rapporti di interdipendenza reciproci fra le fibre nervose che crescono dalle cellule dell'espianto, ove esse conservano la forma tipica, in seno all'espianto si suddividono e danno rami collaterali, ma questi non si anastomizzano mai nell'espianto stesso. Invece i rami che essi forniscono nel plasma formano spessissimo plessi e reti.

Migrazione attiva di cellule nervose nel plasma.

Harrison, Ingebritsen, Drew e Lewis ne fanno breve cenno.

Levi distinse la migrazione passiva dei neuroblasti determinata da retrazione del coagulo, da quella attiva per movimento ameboide.

Olivo (1927) illustrò più ampiamente i due fenomeni ; la migrazione attiva dei neuroblasti è connessa in parte dalla trazione eser-

citata dal neurite che cresce, in parte dall'emissione di tenui membranelle ialine. Vari altri Autori (GRIGORIEFF, MARTINOVIC, LAZARENKO, K. BAUER, SZANTROCH) accennano ai caratteri delle cellule nervose emigrate nel plasma.

Nelle colture di gangli sensitivi la migrazione passiva dei neuroblasti da retrazione del coagulo è rara, e se mai si verifica in colture da espianti meno maturi (non oltre l' 8° giorno). Si presenta coi caratteri ben noti ed essi furono meglio precisati coll'osservazione diretta in vivo e colla cinematografia.

Si vede separarsi una corona di cellule nervose dall'espianto originario col quale restano unite per fibre singole o per fasci di fibre fortemente tese ; esse si assottigliano e si allungano quanto più le cellule nervose si allontanano, le cellule si appiattiscono e più tardi emigrano isolate nel plasma.

La migrazione attiva nel coagulo di cellule nervose si manifesta a preferenza nelle colture, nelle quali i neuriti che sono cresciuti dalle cellule rimaste nell'espianto si anastomizzano fra loro nel plasma.

Il grado di maturità dell'espianto non sembra aver importanza, le cellule nervose migrate son più frequenti, è vero, in colture di embrione di pollo al 7°-8° giorno, ma ne abbiamo visto anche in colture di embrioni al 14° giorno. Parimenti in colture di gangli di embrioni e feti umani si ha migrazione di cellule nervose (Tav. XXXIV-XXXV, fig. *i*). Anche MARTINOVIC descrive in colture di encefalo cellule nervose molto mature migrate (di corteccia di Mammiferi neonati).

Non appena le cellule del ganglio raggiungono il coagulo, il che può avvenire durante le prime 6-7 ore di vita delle colture, subiscono un rilevante mutamento di forma.

Ciò nonostante i lunghi e sottili prolungamenti conferiscono a queste cellule impronta propria, sono veri e propri neuriti identici a quelli cresciuti da cellule dell'espianto ; per la lunghezza considerevole, per il modo come crescono e si ramificano (costante presenza della caratteristica espansione terminale) non possono essere confusi colle propaggini di fibroblasti.

Nelle prime ore di vita della coltura, la migrazione delle cellule nervose è relativamente veloce, poi rallenta e si arresta ; le cellule non si spingono lontano dall'espianto, pur continuando l'accrescimento dei prolungamenti.

Analizziamo i caratteri morfologici di queste cellule migrate ; non appena sono pervenute nel plasma, si appiattiscono ed assu-

mono forma triangolare o poligonale. Anche l' intima struttura del citoplasma si trasforma. Mentre che nelle cellule rimaste nell'espianto si vede, nei preparati all'argento ridotto, il caratteristico reticolo fibrillare, di solito questo diviene meno ben visibile nelle cellule migrate. In un primo tempo hanno all'esame a fresco la refrangenza ben nota delle cellule nervose, più tardi vi appaiono delle grossolane granulazioni. Neppure col metodo all'argento ridotto si riesce a colorare nelle cellule migrate la rete neurofibrillare ; soltanto in qualche cellula ho visto dei fini fasci fibrillari, i quali però erano limitati alla superficie del citoplasma. Si direbbe che la sostanza neurofibrillare, tanto costante nel citoplasma dei neuroni, tenda a scomparire dal pirenoforo, quando il neurone si trova in un mezzo molto diverso dall'abituale ; la trasformazione è probabilmente in rapporto con mutamenti nelle proprietà fisiche del pirenoforo.

Su questo particolare attinente l' intima struttura delle cellule migrate nel plasma non possiamo però pronunziarci ancora in modo deciso ; furono fatte osservazioni in campo oscuro, ma queste non hanno dato ancora risultati concordanti. Soltanto un'analisi approfondita delle cellule nervose viventi, integrata coi risultati dell'osservazione di preparati col metodo all'argento ridotto, potrà portare a risultati concludenti.

Veniamo a considerare i caratteri dei prolungamenti di queste cellule : per la forma, per la struttura e per il modo con cui si accrescono vanno considerati come veri neuriti. Però il modo con cui i prolungamenti si dipartono dal pirenoforo è diverso da quello tipico per le cellule dei gangli. Se la cellula ha forma triangolare od affusata, si vede al polo prossimale, a contorno rotondeggiante, un solo prolungamento, il quale rimane per qualche tempo in connessione coll'espianto, ma poi quando la cellula diviene libera, se ne separa. Nelle cinematografie ci rendiamo ragione che la connessione fra la fibra prossimale e l'espianto limita la migrazione della cellula ; la fibra viene in un primo tempo fortemente stirata, ma poi il movimento ameboide della cellula riesce a vincere quest'ostacolo, la fibra si libera, e la cellula precede più rapidamente.

Il movimento ameboide di queste cellule nel plasma fu studiato nelle cinematografie ; esso non è molto dissimile da quello delle cellule mesenchimali a forma lamellare : si ha un continuo ma lento

mutamento di forma, senza però che siano emesse vere propaggini, come nei fibroblasti in migrazione.

L'estremo distale della cellula si continua in uno o più prolungamenti tozzi nel tratto iniziale e di aspetto protoplasmatico; poi per gradi si vanno assottigliando distalmente, e diventano identici

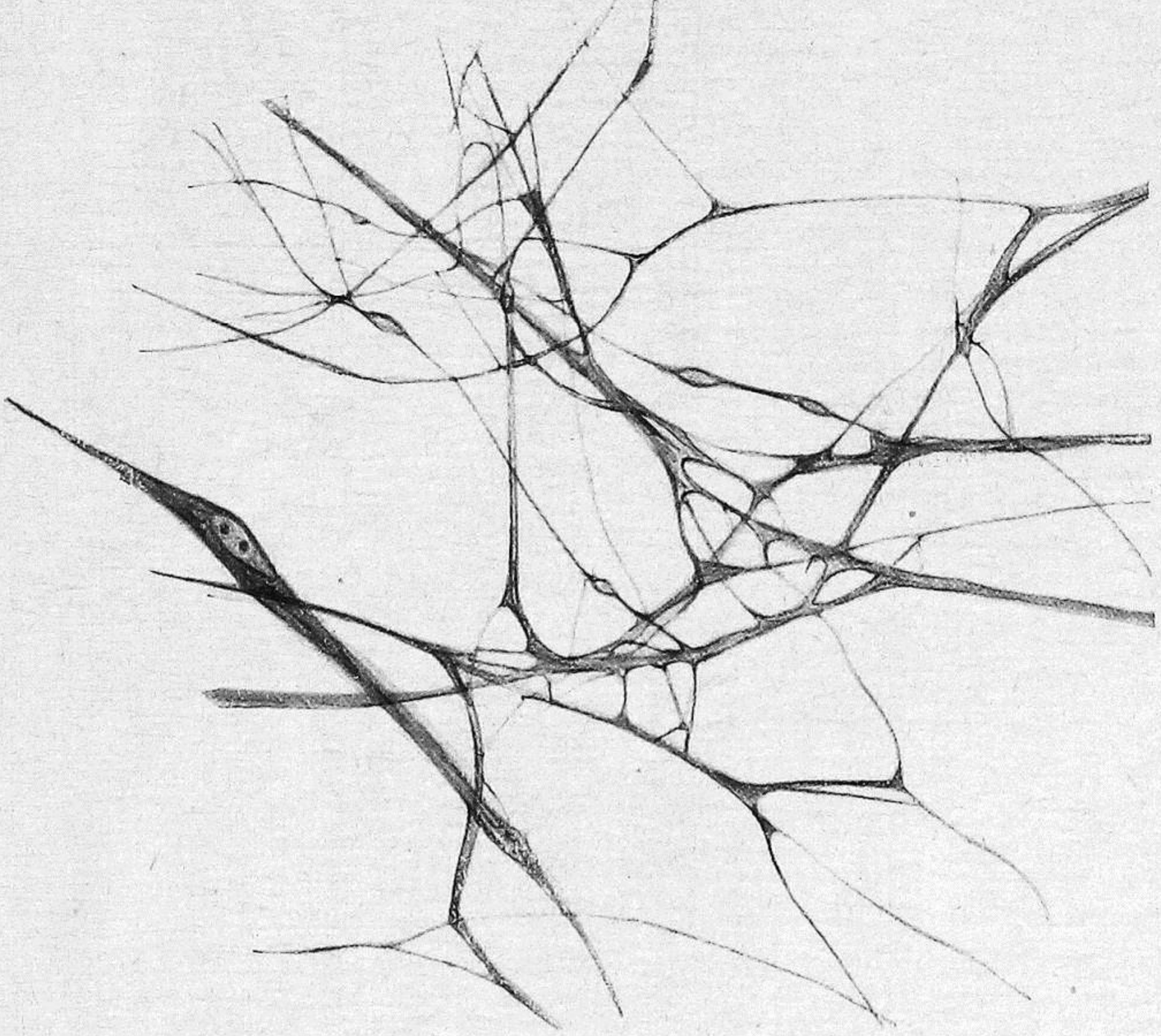

Fig. 22. — Coltura (N. 1842) di ganglio spinale di embrione di pollo (7° g.). Parte prossimale della zona di accrescimento. Anastomosi multiple fra grosse fibre, in vari punti reti a strette maglie. La rete probabilmente deriva da trasformazione di cordoni fibrillari. Una cellula nervosa emigrata. Fiss. liq. Zenker. Ematoss. Held. Ingr. 600 ×.

agli altri. Non appena le cellule sono emigrate nel coagulo, hanno perduto del tutto i caratteri dei neuroni sensitivi e sarebbe impossibile di riconoscerle come tali, se non se ne potesse definire l'origine, pur mantenendo, ben s' intende, lo ripetiamo, per la presenza dei neuriti, quelli di neuroni. E di già poche ore dopo che esse hanno abbandonato l'espianto si trasformano ancor più. Dapprima i neuriti sono relativamente brevi e terminano liberamente, più tardi crescono in lunghezza colle stesse modalità degli altri neuriti, per

movimento ameboide dell'espansione distale e si ramificano; inoltre si uniscono con fibre vicine o lontane (figg. 24, 26 e figg. *h*, *k*,

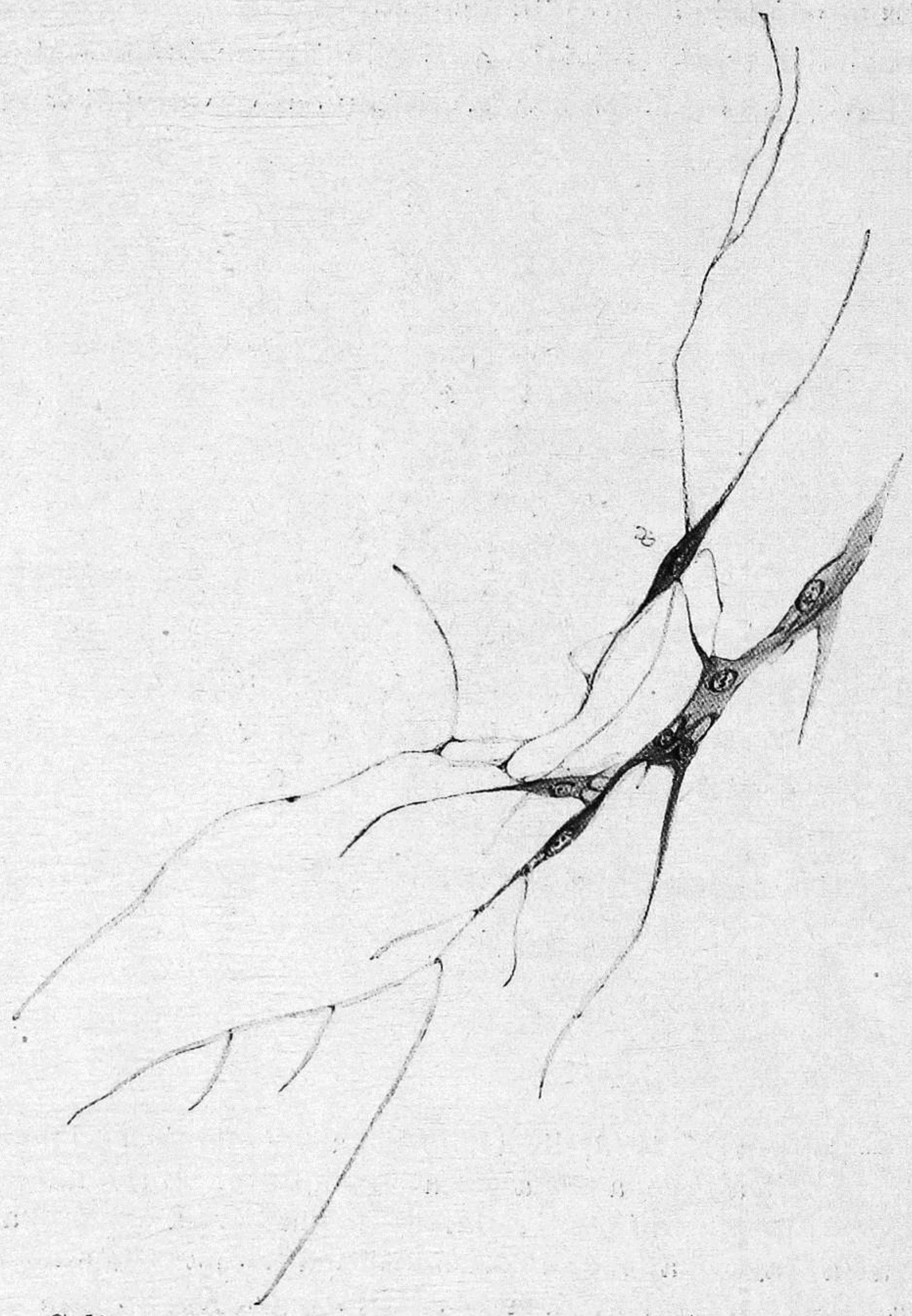

Fig. 23. — Coltura (N. 1990) di g. spinale di embrione di pollo (8° giorno). Parte prossimale della zona di accrescimento. Cellule nervose immigrate nel plasma, in parte affusate in parte lamellari. I rami dei neuriti terminano liberamente; qualche ansa. Fiss. e colorazione come nella fig. 22. Ingr. 200 ×.

in Tav. XXXIV-XXXV, fig. *l* in Tav. XXXVI-XXXVII), le quali possono derivare da prolungamenti di altre cellule emigrate, oppure di cellule rimaste ancora nell'espianto. In tal modo i prolungamenti cellulari partecipano alla costituzione di complicate reti nervose (pag. 475 e seg.).

Le modalità con cui i neuriti delle cellule migrate si ramificano e si anastomizzano sono quanto mai varie. Le figure che presentiamo ci sembrano sufficienti a darne un'idea.

Nelle Tav. XXXIV-XXXV, fig. *i* (da una coltura di embrione umano) si vede una cellula con prolungamenti che terminano libe-

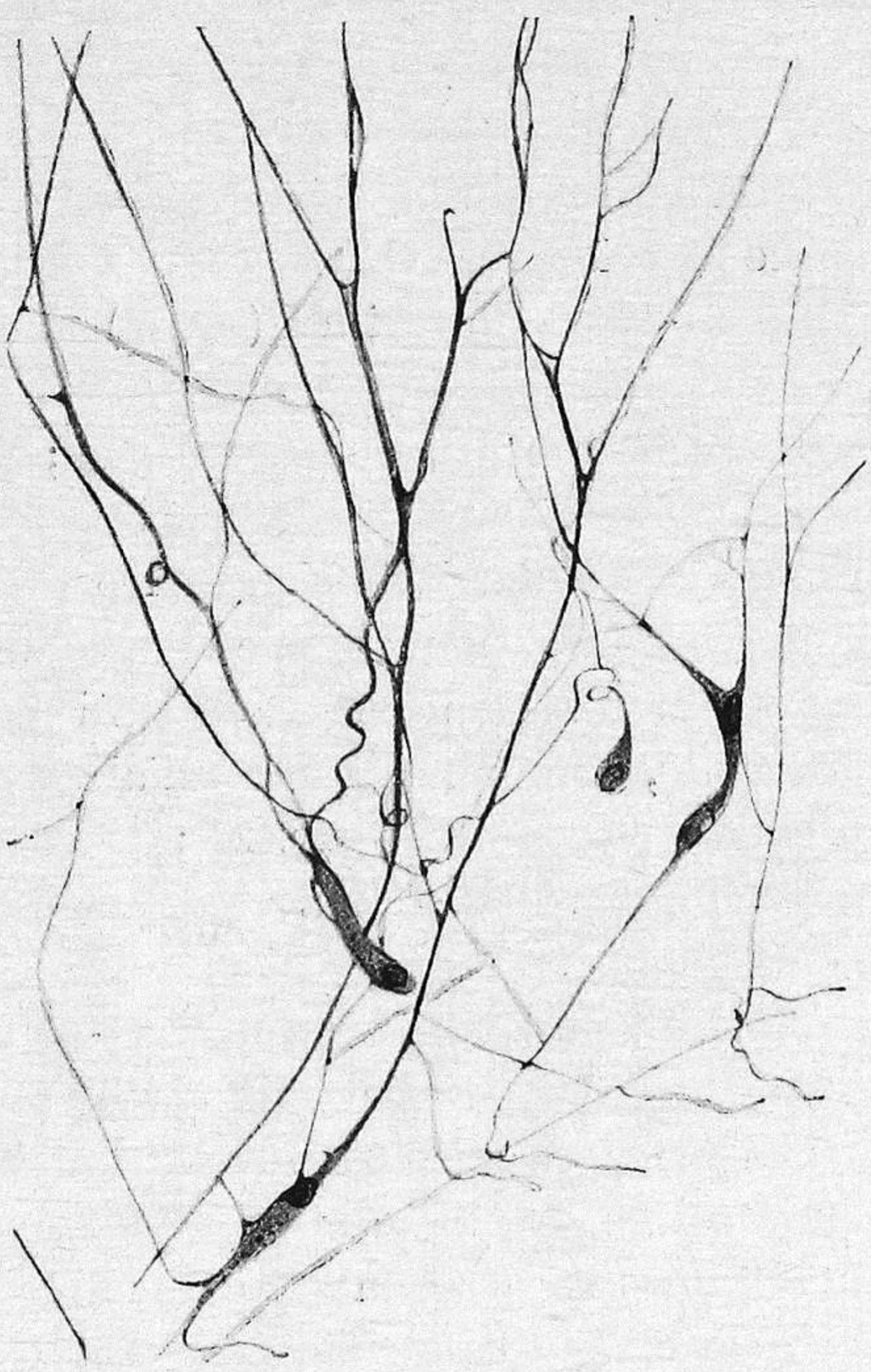

Fig. 24. — Coltura (N. 1726) di ganglio spinale di embrione di pollo (7 g.). Parte prossimale della zona di accrescimento. Cellule nervose immigrate nel plasma con neuriti multipli ramificati ed anastomizzati. Fiss. e coloraz. come nella fig. 22. Ingr. 350 ×.

ramente. La cellula è emigrata di recente e le connessioni dei suoi prolungamenti colle fibre contigue pure libere, non sono ancora avvenute. Anche le cellule riprodotte a fig. 23 sono migrate di recente, due di esse hanno forma affusata, altre tendono a divenir lamellari; i prolungamenti distali sono poco ramificati, sul tragitto del neurite sono apparse delle anse; s'incomincia a formare qualche anastomosi fra cellule contigue.

La fotografia (Tav. XXXIV-XXXV, fig. *h*) nella quale è riprodotta a debole ingrandimento la parte prossimale della zona di accrescimento di una coltura vivente, vale a dare una rappresentazione d' insieme delle modalità con cui cellule nervose emigrate con prolungamenti grossi e cresciuti molto in lunghezza si anastomizzano fra loro e con fibre che partono da cellule dell'espianto. Si vedono fibre unirsi ad arcata e ad angolo acuto. Le connessioni sono in questa coltura molteplici e complesse.

Si prestano ad un'analisi più particolareggiata di quelle connessioni la fig. *k*, nelle Tav. XXXIV-XXXV ed *l* nelle Tav. XXXVI-XXXVII e le figg. 24-26. Nella prima (fig. *k*) si è formata una rete a larghe maglie costituita dalle anastomosi fra i prolungamenti di una stessa cellula e di cellule contigue ; alla costituzione di questa rete partecipano pure i filamenti provenienti dall'espansione terminale della fibra *F*. Non molto diversa è l' imagine riprodotta alla fig. 24, nella quale i prolungamenti delle cellule sono lunghissimi e riccamente ramificati ed i rami, pur terminando liberamente, sono uniti l'uno all'altro da anastomosi. Più complessa è la rete riprodotta a fig. 25 ; vi vediamo vari rami anastomotici fra prolungamenti di una stessa cellula ed altri che collegano cellule vicine.

Interessante riesce il confronto fra le figg. 24-25 e 26. Le cellule emigrate sono nelle due prime, come nella terza, molto appiattite, hanno contorno irregolare ed emettono vari lunghissimi prolungamenti, ma nelle figg. 24, 25, nonostante le molteplici anastomosi fra prolungamenti di una stessa cellula e di cellule vicine, l' individualità dei vari neuroni è tuttora riconoscibile, e lo è pure nella fig. *l* (Tav. XXXVI-XXXVII), la quale ha una certa analogia colle figg. 24 e 25. Invece nella fig. 26 le anastomosi sono incomparabilmente più numerose ed in vari punti si vede una rete a strette maglie, l' individualità dei singoli neuroni tende a cancellarsi.

In alcune cellule nervose immigrate nel plasna (in colture di gangli di embrioni all' 8° giorno) abbiamo visto figure mitotiche.

Di recente G. Levi ed H. Meyer hanno descritta la riproduzione mitotica di cellule nervose in colture di encefalo. Ma mentre in quest'ultime Levi e Meyer hanno seguito *in vivo* il succedersi delle trasformazioni delle cellule durante la mitosi, ciò non fu possibile, per ragioni sulle quali non insisteremo, nelle colture di gangli, e ci siamo limitati all'esame di colture fissate. In alcune di queste

(colorite coll'ematossilina Held) abbiamo constatato che durante la mitosi persistono ai poli lunghi neuriti collegati con qualche ramo alla rete di fibre nervose. Da una cellula alla fase di monaster si diparte ad un polo un solo neurite, mentre dall'altro polo si originano 3 neuriti, gli uni e gli altri si portano a distanza senza divi-

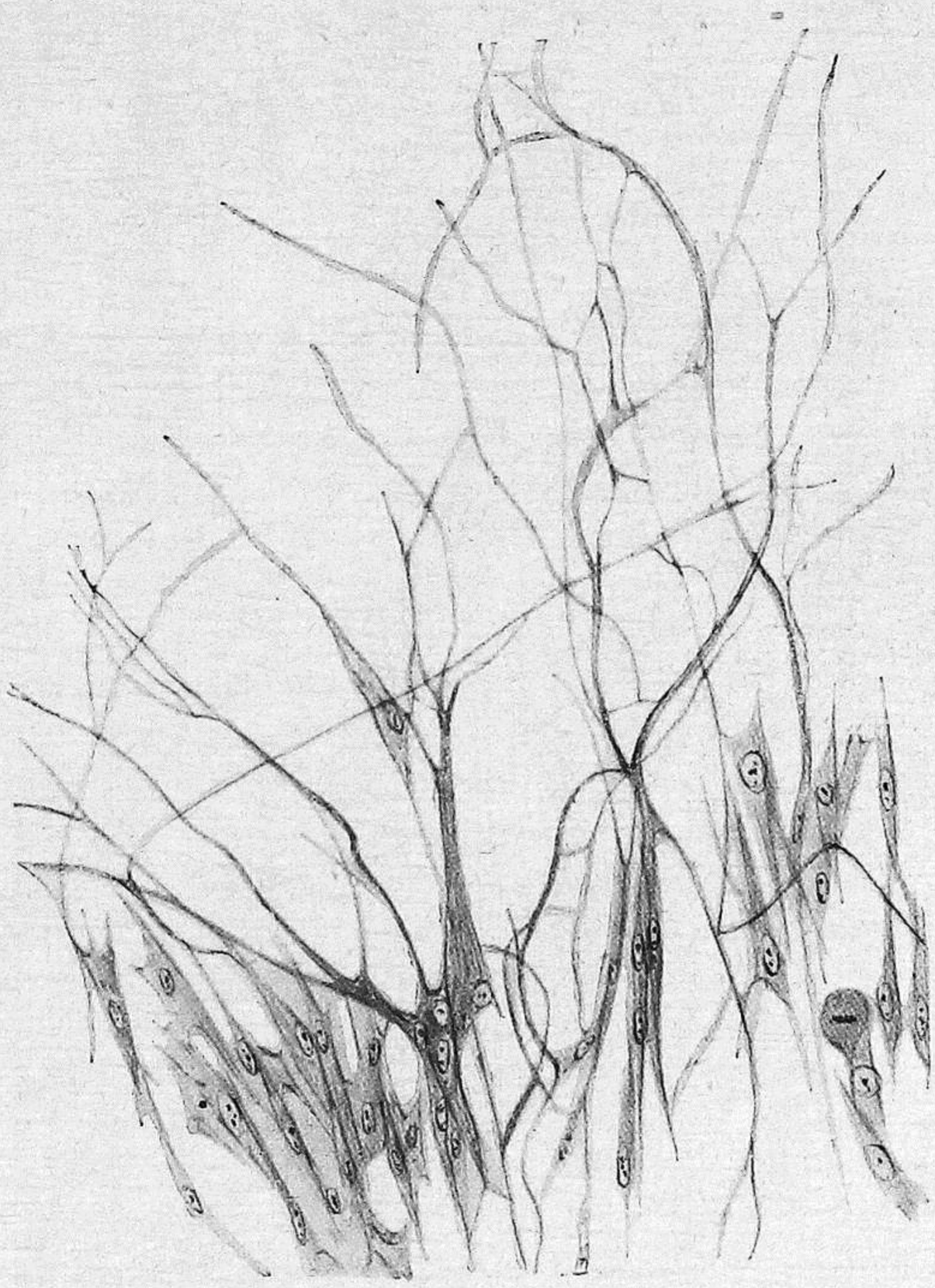

Fig. 25. — Coltura (N. 2003) di g. spinale di embrione di pollo (8° g.). Parte prossimale della zona di accrescimento. Cellule nervose lamellari e mesenchimali immigrate nel plasma. Le prime emettono prolungamenti tozzi ramificati ; anastomosi fra i rami dei neuriti della stessa cellula e di cellule vicine. Fiss. e coloraz. come nelle figg. 23-24. Ingr. 240 ×.

dersi. Altre mitosi furono sorprese alla fase di diaster : in una di queste una cellula figlia aveva un neurite, l'altra ne era priva. Per la persistenza dei caratteri di elementi nervosi durante la mitosi, non ci sembra che la riproduzione si associ ad una sdifferenziazione delle cellule.

In armonia con quanto Levi e Meyer hanno visto nelle colture di encefalo dopo vari passaggi, le cellule nervose regrediscono, ma

non si sdifferenziano. Le trasformazioni alle quali le cellule gangliari

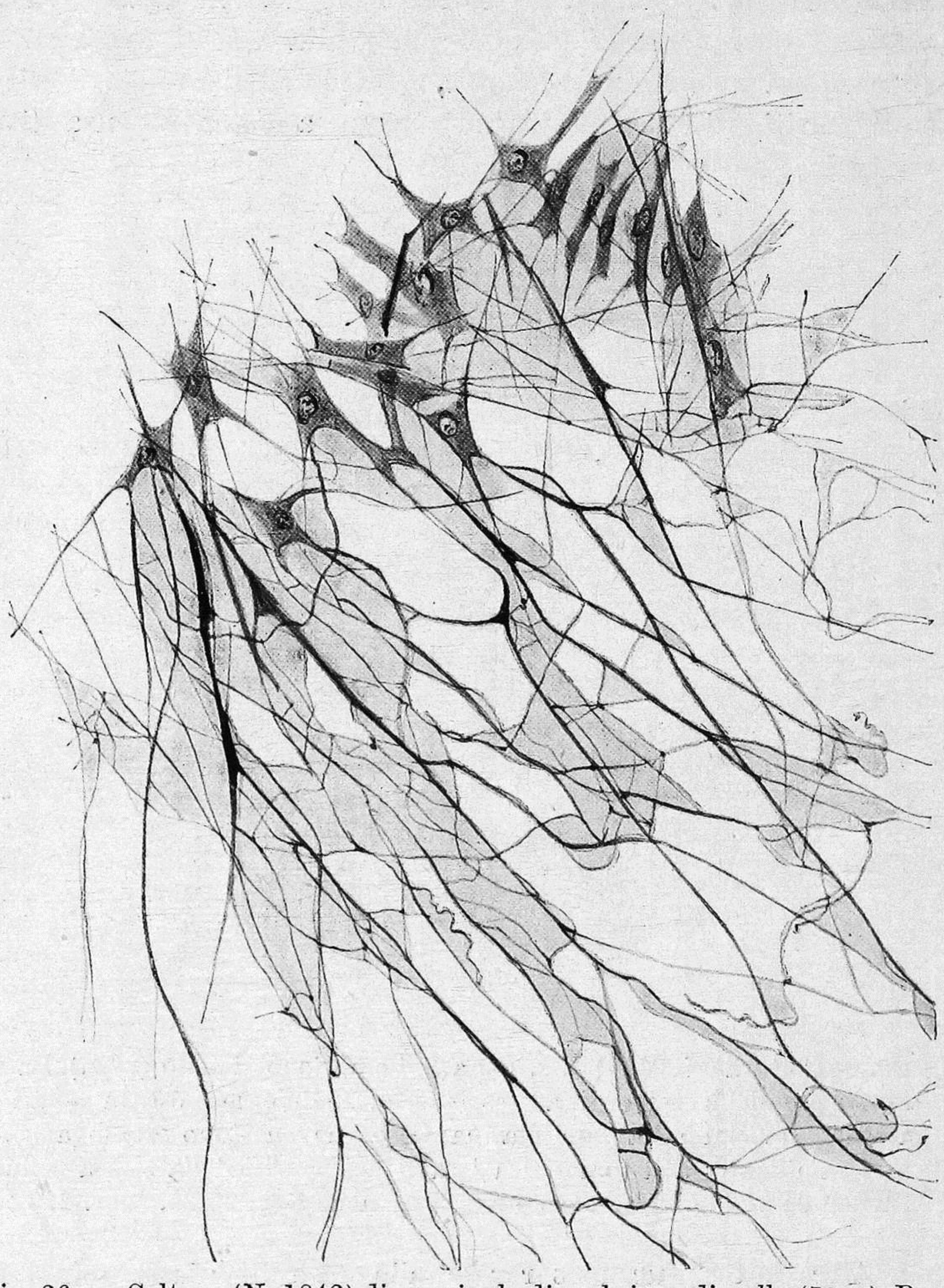

Fig. 26. — Coltura (N. 1842) di g. spinale di embrione di pollo (7° g.). Parte prossimale della zona di accrescimento. Cellule nervose lamellari e cellule mesenchimali immigrate nel plasma. Complesse anastomosi a rete fra i prolungamenti delle cellule nervose. Fiss. e coloraz. come nelle figg. 23-25. Ingr. 220 ×.

vanno soggette, sono l'espressione di un adattamento al nuovo ambiente, non di una sdifferenziazione.

Accrescimento dei cordoni o nastri fibrillari.

In molte colture di gangli di embrioni dal 7° al 14° giorno si vedono vari neuriti convergere in cordoni a forma lamellare, forma la quale si accentua nel tratto distale, ed a struttura fibrillare.

Digià Burrows ne aveva succintamente fatto cenno. Più tardi uno di noi li studiò più ampiamente in colture di encefalo di embrioni precoci (Levi 1917), e Mossa 1928 ne confermò l'esistenza in colture di gangli. Levi ha notato che la convergenza dei neuriti in un fascio avveniva talora al margine dell'espianto ; anche più evidente è l'origine dei neuriti del fascio dei vari neuroblasti quando essi sono migrati nel plasma, oppure quando i neuriti si riuniscono in un fascio a distanza dall'origine. Si ripete nelle colture la disposizione fascicolata od a cordone. (« Kabelform » degli A. tedeschi) che è tipica per i nervi degli Invertebrati e che si trova negli embrioni di Vertebrati prima che nelle fibre nervose si siano differenziate le guaine.

Però questi fasci appiattiti differiscono da quelli dell'embrione per qualche importante particolare. Il più essenziale è che l'accrescimento del fascio non è, come si potrebbe supporre, la resultante dell'accrescimento individuale dei singoli neuriti ; bensì si compie per « movimento di massa ». L'estremità si espande in un ciuffo di filamenti provenienti da tutta la massa neurofibrillare del fascio, oppure terminano con masse ameboidi, dalle quali si irradiano sottili filamenti. Appaiono come un'unica fibra gigantesca nella quale l' individualità dei singoli neuriti è scomparsa. Il « cavo » sembra crescere per l'attività ameboide di un' unica espansione terminale, e l' A. ritenne che fra i singoli neuriti debbano esistere scambi materiali, sebbene sia difficile il decidere se l' individualità dei singoli componenti sia davvero scomparsa.

Negli studi di Grigorieff, di Lazarenko, di Martinovic, di Bauer non si fa alcun cenno dell'esistenza nelle colture di tessuto nervoso di tronchi fibrillari.

Noi abbiamo rivolto speciale attenzione durante le nostre ricerche a queste singolarissime strutture ; non soltanto esse non hanno riscontro, in alcun altra conosciuta dal tessuto nervoso dell'organismo, ma la costituzione e l'accrescimento di esse è in palese contrasto colle conoscenze attuali sulla morfologia e sull' istogenesi dei neuroni.

Per il considerevole appiattimento a cui sono soggetti, è più appropriata la denominazione di *nastri* piuttosto che di cordoni.

A fresco hanno struttura fibrillare, ma non sempre ben distinta (Tav. XXXIV-XXXV, fig. *m*) ; essa si accentua nel materiale fissato ; si vede bene in preparati fissati in liquido Zenker colorati coll'ematossilina Held o col metodo all'argento ridotto (figg. 27-29).

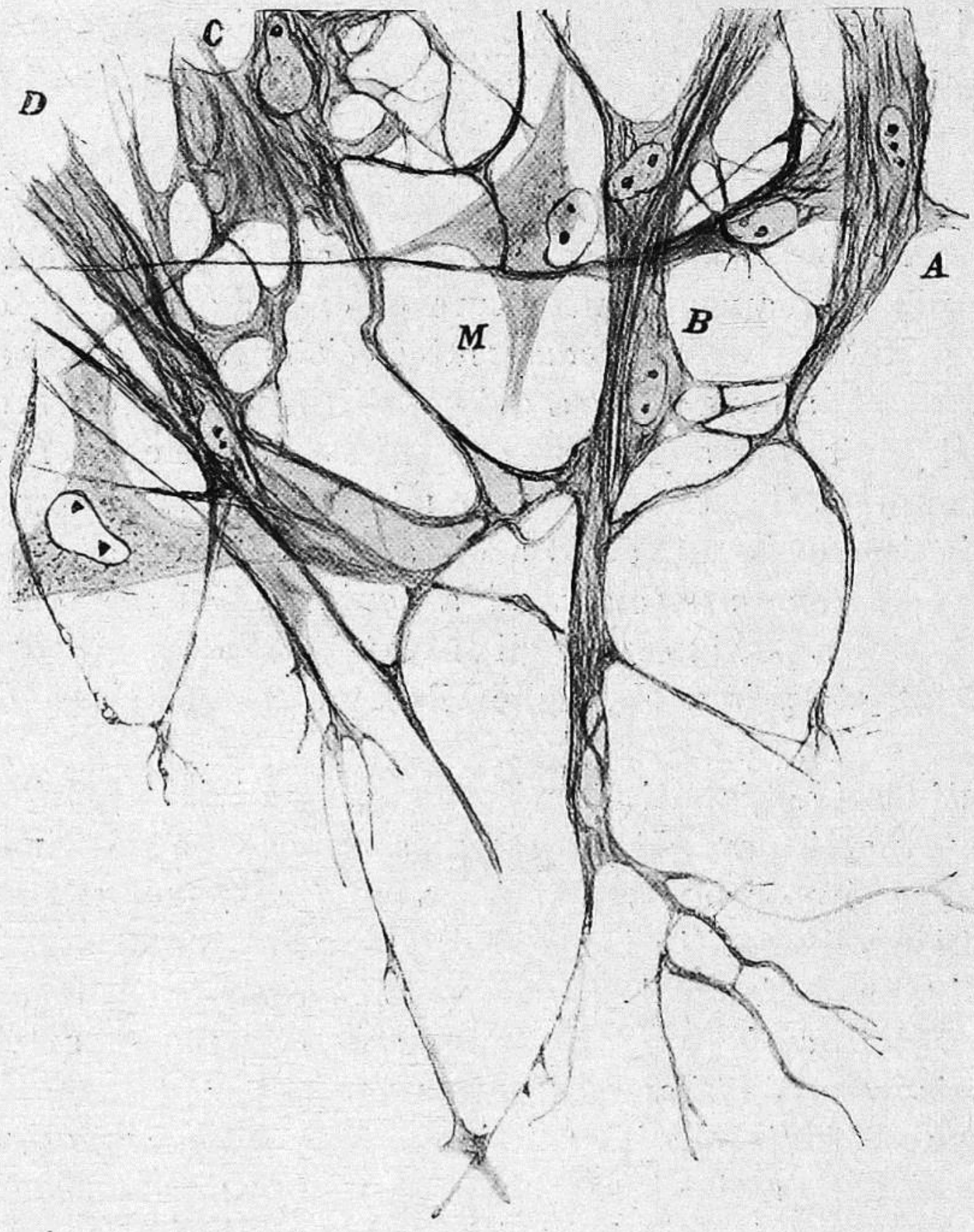

Fig. 27. — Coltura di g. spinale di embrione di pollo (7° g.) fissata dopo 24 ore. Cellule nervose migrate nel plasma (parte contigua all'espianto) espanse in lamine allungate a nastro, a struttura fibrillare (*A,B,C,D.*) Si assottigliano continuandosi in prolungamenti ramificati ; anastomosi fra le cellule nervose. *M*, cellule mesenchimali. Fiss. e color. come nelle figg. 23-26. Ingr. 475 ×.

I nastri fibrillari potrebbero essere confusi da un occhio inesperto coi fasci compatti di neuriti, i quali si vedono spesso nelle colture di gangli (Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *n*) ; essi però ne differiscono per struttura e modalità di accrescimento. Nei fasci di neuriti l'individualità dei singoli componenti è ben manifesta, non lo è affatto nei nastri, i quali hanno una struttura fibrillare finissima, talora

a stento apprezzabile a fresco, e che non può essere scambiata colla struttura che ha un fascio di neuriti (cfr. figg. *m* ed *n*).

Inoltre un fascio di neuriti si assottiglia gradatamente in direzione distale, perchè l'accrescimento dei suoi vari componenti è

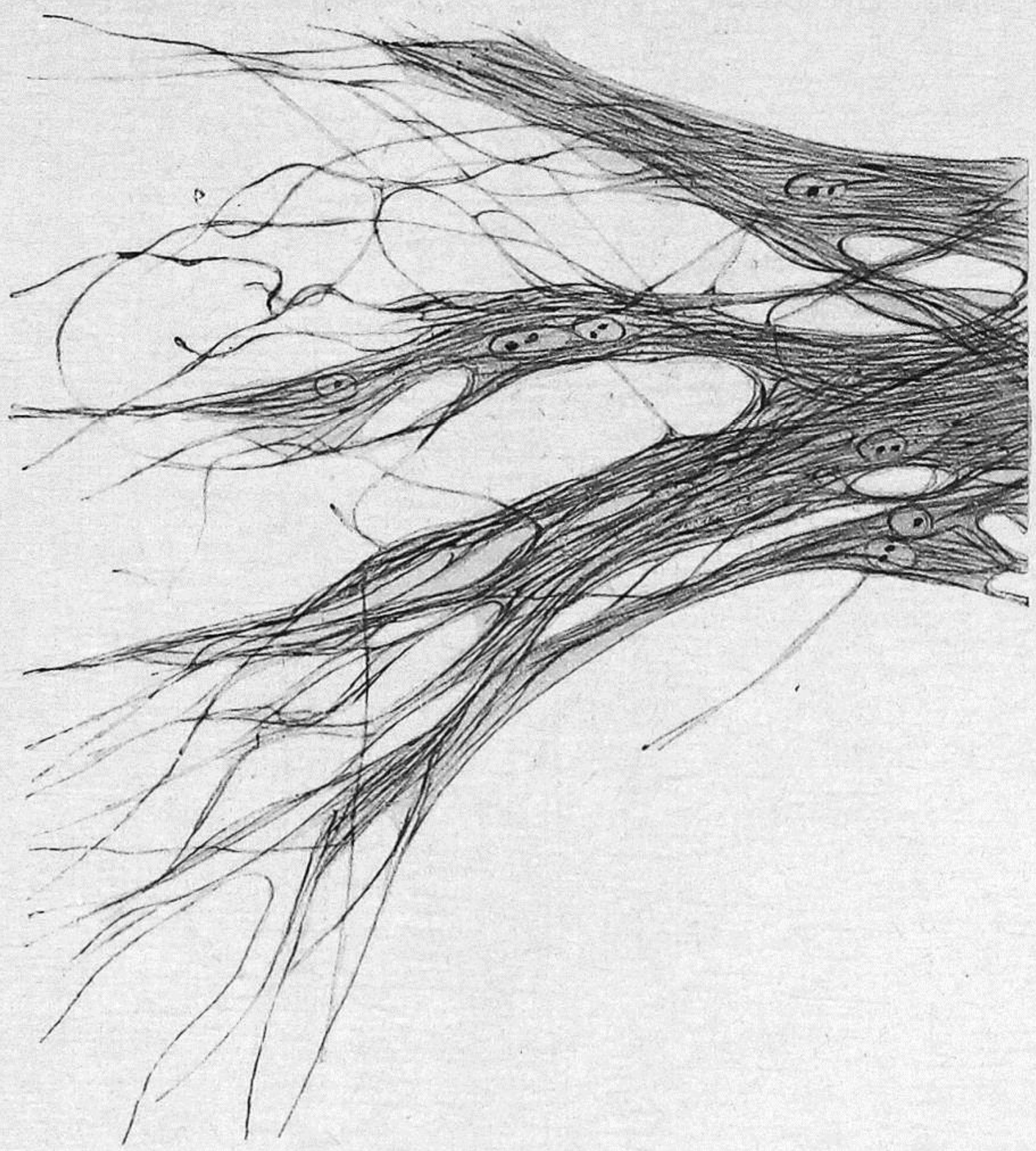

Fig. 28. — Coltura (N. 2235) di g. spinale di embrione umano di 20 mm. di lungh. Larghi nastri fibrillari derivati da cellule nervose immigrate nel plasma. Formazione di lacune in seno ai nastri. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 475 ×.

ineguale e non raggiungono tutti simultaneamente la stessa lunghezza (Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *n*), essi prima o poi si separano dal fascio. Invece un nastro fibrillare cresce come un' unità, la sua espansione terminale è paragonabile a quella di una fibra colossale ed i rami terminali e collaterali si originano come nei neuriti singoli.

I nastri fibrillari crescono precocemente nelle colture di gangli. Si vede apparire lungo il contorno dell'espianto una rete di grosse trabecole che si estende a poco a poco sul plasma. Però i tronchi

possono essere distinti, e collegati soltanto da fibre sottili, si anastomizzano anche con neuriti contigui. Distalmente terminano come i neuriti singoli con espansioni ameboidi a filamenti sottili, ma più voluminose e con filamenti più lunghi, ramificati (Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *n*). Quando il nastro ha una certa lunghezza si sud-

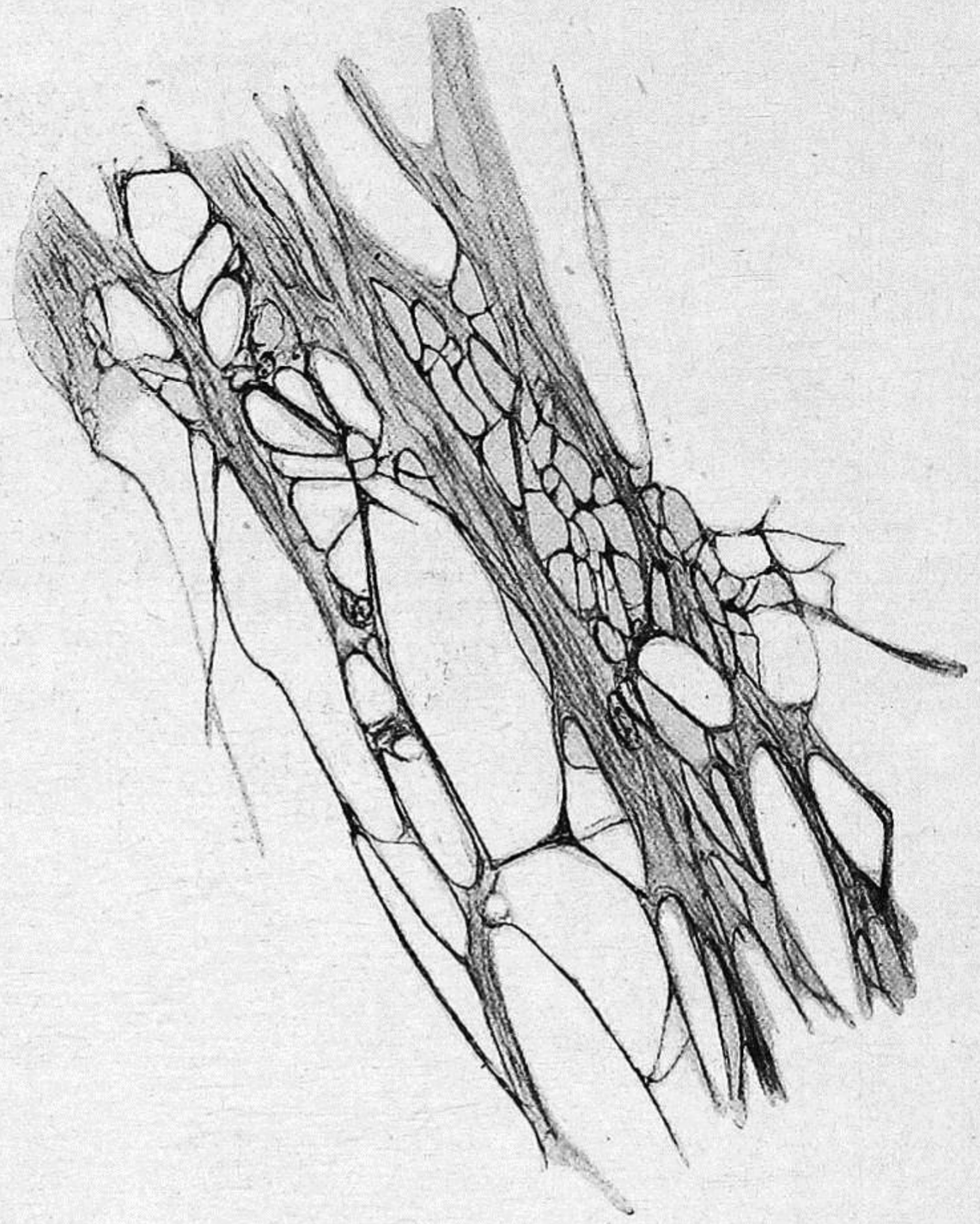

Fig. 29. — Coltura di ganglio spinale di embrione di pollo. Nastri fibrillari nei quali s' inizia la formazione di lacune piene di liquido ; s' incominciano a formare reti a fibre sottili ed a strette maglie. Fiss. liq. Zenker Ematoss. Held. Ingr. 390 ×.

divide all'estremo in fibre libere (fig. 27), di vario spessore, che crescono, come tutte le altre fibre, per movimento ameboide, inoltre nuove collaterali si formano, libere oppure anastomizzate ; così la rete nervosa preesistente diviene più complessa.

Varie imagini da noi riscontrate nelle colture di gangli ci hanno concesso di precisare come i nastri fibrillari si formino. Talora vari neuriti appiattiti convergono in un fascio compatto, che cresce come una massa unitaria, vedi specialmente figg. 5, 7 nella monografia di Levi del 1917. Tale origine dei nastri fibrillari frequente nelle

colture di encefalo di embrioni precoci, è più rara nel materiale da noi attualmente studiato (colture di gangli maturi). Per lo più i nastri sono il risultato di trasformazioni delle cellule nervose emigrate nel plasma. Le cellule nervose non appena si affacciano nel plasma si appiattiscono e si allungano straordinariamente, il limite fra pire-

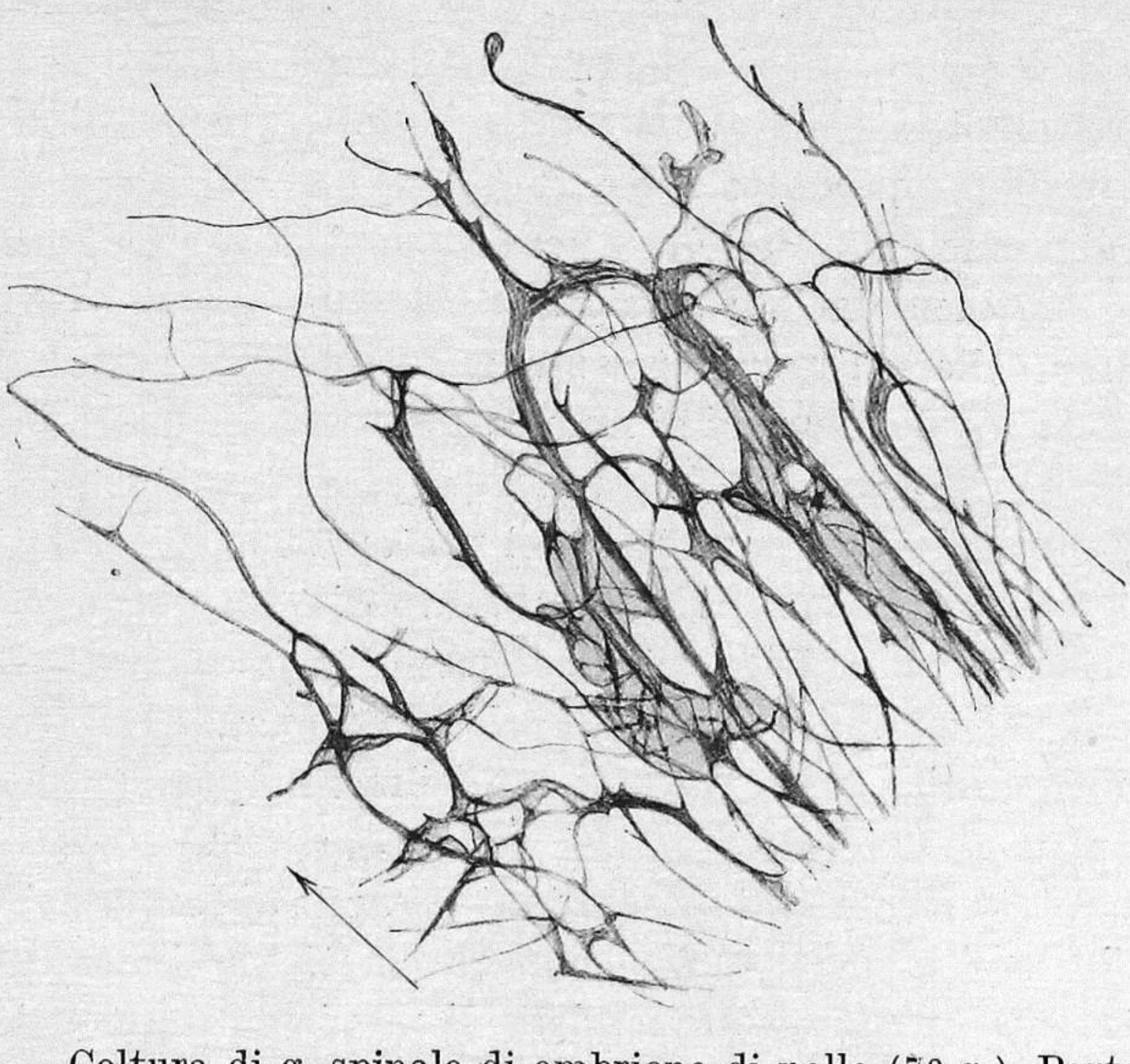

Fig. 30. — Coltura di g. spinale di embrione di pollo (7° g.). Parte prossimale della zona di accrescimento. Reti intricatissime a grossolane trabecole fibrillari ed a sottili fibre, derivata da formazioni di lacune in seno a nastri fibrillari. Fiss. e color. come nella fig. 29. Ingr. 480 ×.

noforo e neurite non è più riconoscibile ; tutta la cellula prende la forma di un nastro a struttura fibrillare, che a distanza si suddivide in varie fibre libere, oppure anastomizzate (fig. 27). Accade pure che varie cellule così trasformate confluiscano in un unico nastro di considerevole diametro che cresce come un tutto e nel quale i limiti fra le varie unità sono a stento riconoscibili o si cancellano del tutto.

Mentre adunque talora (specialmente nelle colture di encefalo) i nastri fibrillari o « cavi » si formano per riunione di fibre originatesi da cellule dell'espianto, molte altre volte si formano da cellule nervose trasformate sin dal momento in cui incominciano a migrare nel plasma.

Nella fotografia (Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *n*) ottenuta da una coltura vivente, si vede un cospicuo tronco derivato dalla riunione delle espansioni nastriformi di due cellule nervose trasformate al punto che a stento sono riconoscibili come tali.

Nella fig. 27 si vedono varie cellule nervose trasformate in larghe lamine a struttura fibrillare ; in *A*, *C*, *D*, si vedono cellule nervose singole ; in *B* due cellule si sono unite in un unico tronco ; molteplici rami anastomotici collegano le varie cellule. Parimenti le larghe lamine fibrillari riprodotte a fig. 28 (coltura di ganglio di embrione umano) derivano da varie cellule nervose appiattite sin dal momento in cui hanno incominciato a migrare nel plasma. Queste strutture, come altre nelle colture di tessuto nervoso, sono l'espressione di un adattamento dei neuroni al nuovo ambiente. Anche in questi elementi, come nelle cellule mesenchimali e negli epiteli, si manifesta una rilevante espansione in superficie del protoplasma, per effetto della quale la forma del neurone diviene tanto diversa da quella tipica. La forma a lamina sottile è evidentemente la più favorevole per la migrazione dei neuroni, come di altri elementi, quando essi trovandosi in un mezzo di scarso spessore, difficilmente possono insinuarsi in seno al mezzo stesso.

Ma nonostante un mutamento tanto grande di forma nei neuroni espansi in lamine, persistono alcune proprietà specifiche, prima di ogni altra quella particolare varietà di movimento ameboide colla quale formano i neuriti ; inoltre persiste in essi la sostanza neurofibrillare.

I nastri fibrillari non sono strutture definitive, essi si trasformano ulteriormente. Levi, 1917, aveva notato in colture di encefalo viventi che nello spessore dei tronchi si formano lacune piene di liquido, che si estendono ben tosto e divaricano i fasci fibrillari che li delimitano ; per effetto della distensione che subiscono i fascetti, si assottigliano gradatamente e così si formano intricate reti a strette maglie.

Nelle colture di gangli è frequente un'analoga trasformazione dei fasci fibrillari (fig. 29), derivino essi da convergenza di neuriti, o da trasformazione di pirenofori. Anzi noi abbiamo constatato che le reti a strette maglie ed a grosse trabecole visibili nella parte prossimale della zona di accrescimento (figg. 22, 30) derivano sempre per questo processo di vacuolizzazione dei tronchi fibrillari, il quale, conviene accentuarlo, si produce prima che i tronchi siano cresciuti

sino alla periferia della zona di accrescimento. Ed infatti le reti a strette maglie sono di solito circoscritte alla parte prossimale di quella zona.

Migrazione nel plasma di cellule di natura non nervosa e loro rapporti colle fibre nervose.

Questo particolare fu studiato specialmente da ESAKI e da GRIGORIEFF. Secondo ESAKI in espianti di gangli di embrioni di 4-7 giorni di incubazione le fibre cresciute nelle prime 24 ore di vita della coltura non sono accompagnate da cellule ; queste appaiono nel plasma al 2° giorno, si fanno più numerose al 3° giorno. Le fibre sono unite passivamente in cordoni del movimento delle cellule. ESAKI distingue due tipi di cellule di forma e di origine diversa ; le une piccole, affusate, corrispondono alle cellule che nell'embrione accompagnano le fibre nervose (lemnoblasti di LENHOSSÉK), le altre sono grandi, appiattite a forma irregolare e derivano dal mesenchima del ganglio. ESAKI ritiene che le cellule mesenchimali non abbiano alcun rapporto materiale colle fibre nervose, i lemnoblasti invece aderiscono a queste, e specialmente ove le fibre si anastomizzano a vicenda.

GRIGORIEFF ha confermato quanto ESAKI aveva visto sugli stretti rapporti materiali fra fibre e cellule, però ritiene che questi rapporti non siano limitati ai lemnoblasti emigrati dall'espianto. GRIGORIEFF ha espiantato tessuto nervoso assieme a mesenchima, epitelio e tessuto muscolare, ed ha visto che le fibre nervose crescono in intima connessione con tutti questi elementi. E l'adesione non sarebbe contingente : le cellule eserciterebbero azione neurotropica sulle fibre in accrescimento. Delle connessioni fra neuriti cresciuti in vitro e cellule di altra natura si parla anche nelle memorie di LAZARENKO e di K. BAUER. Specialmente quest'ultimo insiste sui rapporti fra fibre e « cellule nevrogliche secondarie », le quali sarebbero secondo l'A., equivalenti ai lemnoblasti delle colture dei gangli ; esse seguono le fibre nervose e dopo essersi allineate a catena si uniscono secondariamente ad esse ; anche quest'A. ammette come GRIGORIEFF che le fibre penetrino nel citoplasma delle cellule.

Nelle colture di gangli sensitivi la migrazione di cellule di apparenza mesenchimale è frequente, ma non costante. Abbiamo visto colture con un esuberante accrescimento di fibre nervose e del tutto prive di cellule mesenchimali migrate.

Premettiamo che con questa designazione di « cellule di aspetto mesenchimale » non intendiamo di pregiudicare per il momento il nostro giudizio sulla loro origine. È possibile che, come ritiene ESAKI, i lemnoblasti derivati dagli elementi dell'abbozzo del gan-

glio, i quali non si sono differenziati in cellule nervose, possano essere riconosciuti dalle vere cellule del mesenchima. Certamente si tratta di differenze sottili e non sempre apprezzabili nella zona di accrescimento (v. più oltre).

Soltanto nelle colture di gangli di embrioni al 5° giorno le cellule migrano precocemente, nelle altre si fanno numerose nel plasma,

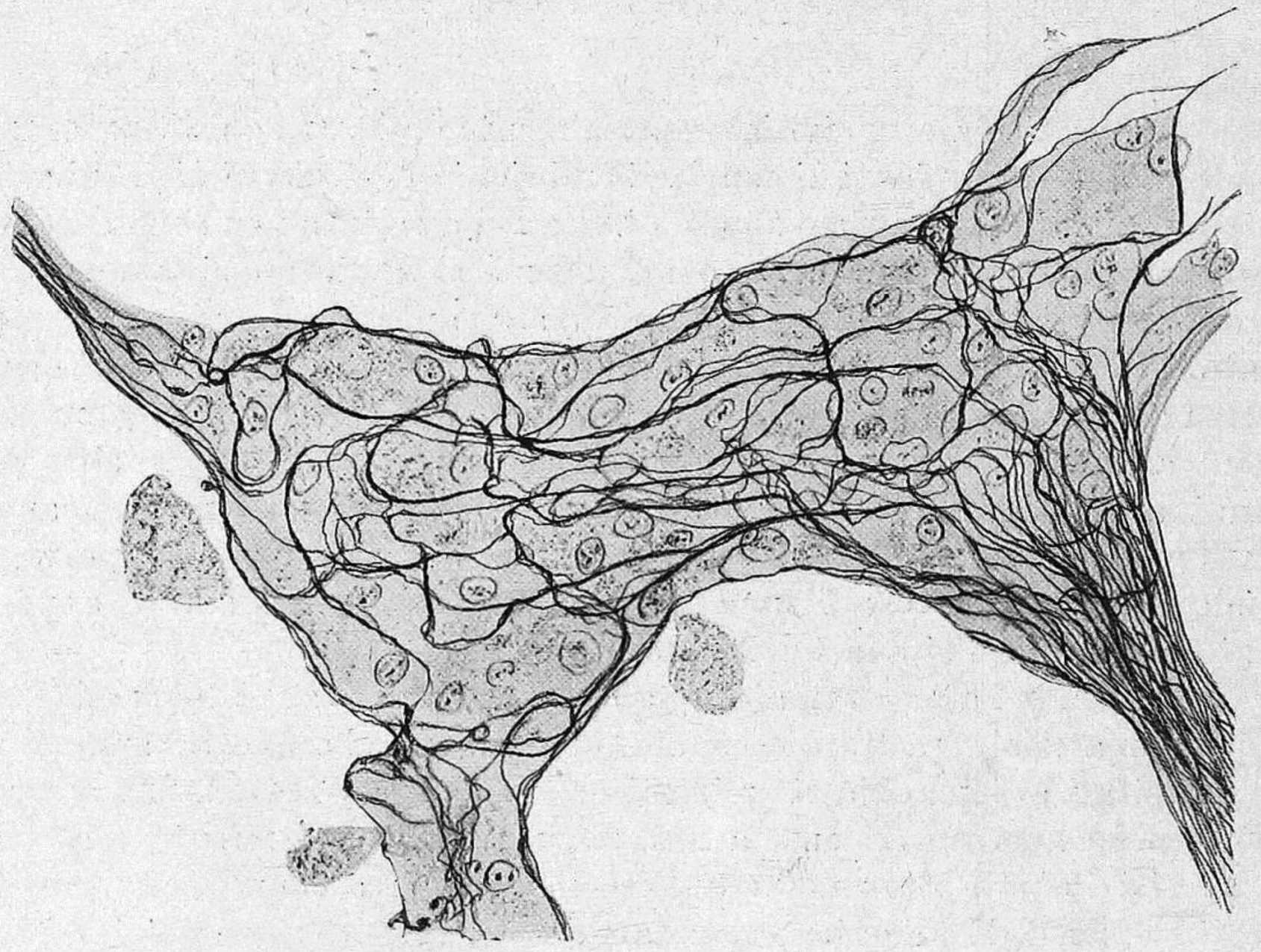

Fig. 31. — Coltura di embrione di pollo di 3 giorni ; rete formata a spese di un plesso di fibre cresciute da un ganglio encefalico ; cellule (mesenchimali o lemnoblasti ?) satelliti della rete, le quali si plasmano esattamente sulla forma di questa. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 475 ×.

quando le fibre nervose hanno una considerevole lunghezza, per lo più verso la metà del 2° giorno di vita della coltura ed anche più tardi.

Questa circostanza da per sè sola, come pure l'altra, che in molte colture la migrazione manca del tutto, bastano a provare che non vi è nesso causale indispensabile fra la migrazione di cellule e l'accremento delle fibre. Le cellule si addossano in un secondo tempo alle fibre già cresciute, come ESAKI e BAUER hanno visto. Ci rimane da analizzare la natura di questi rapporti.

In alcuni punti di varie colture noi vediamo che le cellule aderiscono strettamente ai plessi di fibre. Meglio che in ogni altra col-

tura ciò appare in quella di gangli encefalici dell'embrione di 3 giorni, di cui abbiamo già fatto cenno : nella fig. 31 si vede un fascio di fibre risolversi in una complicata rete ; cumuli di cellule grandi,

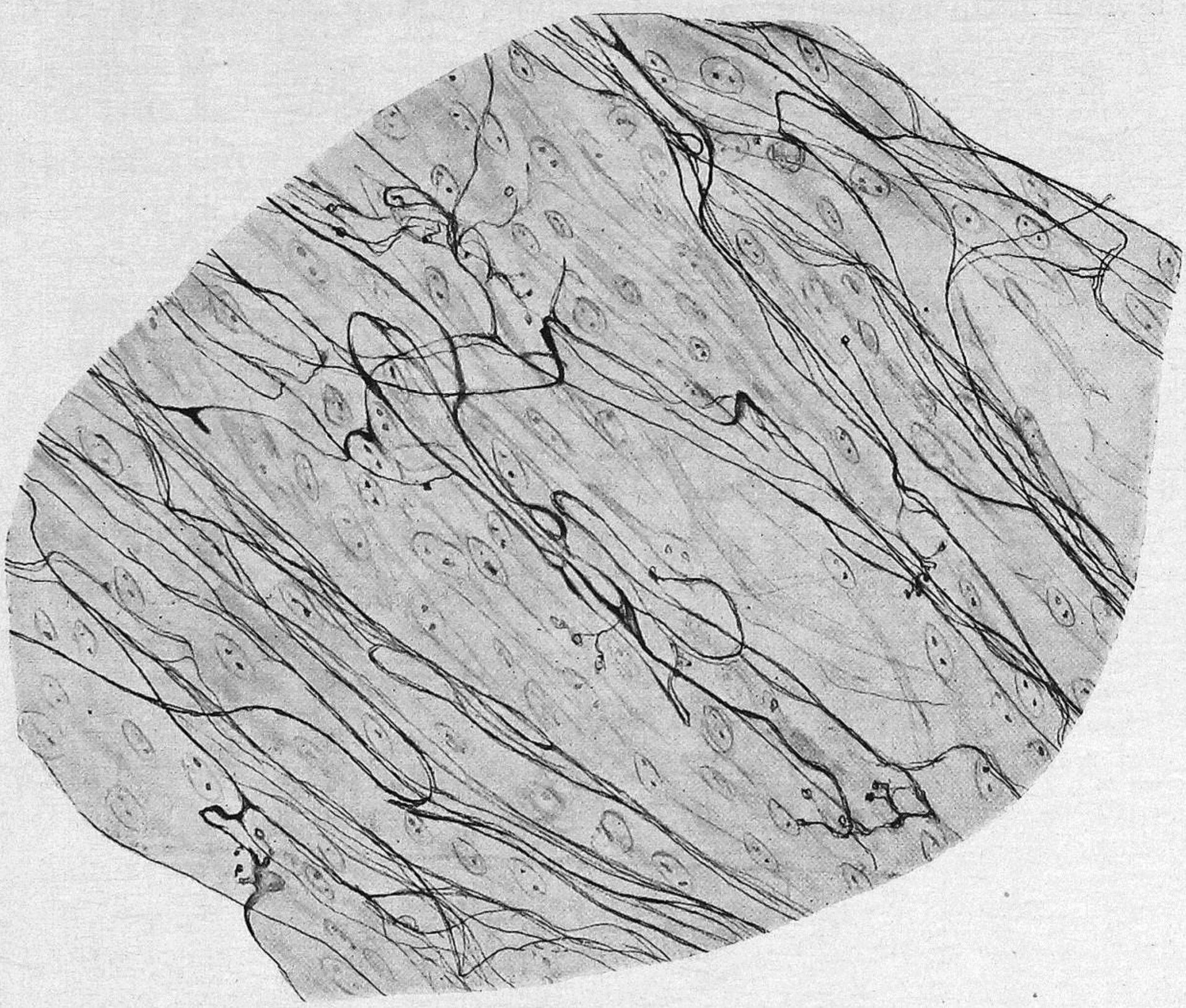

Fig. 32. — Coltura (N. 2139) di g. spinale di embrione di pollo (8° g.). Parte prossimale della zona di accrescimento; molte cellule di aspetto mesenchimale immigrate nel plasma, in parte in contatto col vetrino ; le fibre sono cresciute prevalentemente nello spessore del plasma, hanno un decorso irregolare, in alcuni punti descrivono spire ed anelli, in altri formano plessi. Molti ispessimenti sul tragitto delle fibre. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 315 ×.

rotondeggianti si adattano esattamente alla forma dei plessi e delle reti al punto che il contorno delle cellule non sorpassa in alcun punto il contorno del plesso stesso ; si direbbe che la forma delle prime si plasmi sul modello rappresentato dal secondo. Però vi sono in questa stessa coltura anche plessi e reti senza rapporto di sorta in cellule.

In colture di gangli più maturi si vede di solito nella parte prossimale della zona di accrescimento uno strato ad elementi appiattiti trasparenti, aderenti al vetrino, essi non sembrano avere rapporti ben definiti coi plessi e colle reti di fibre nervose cresciute nel pla-

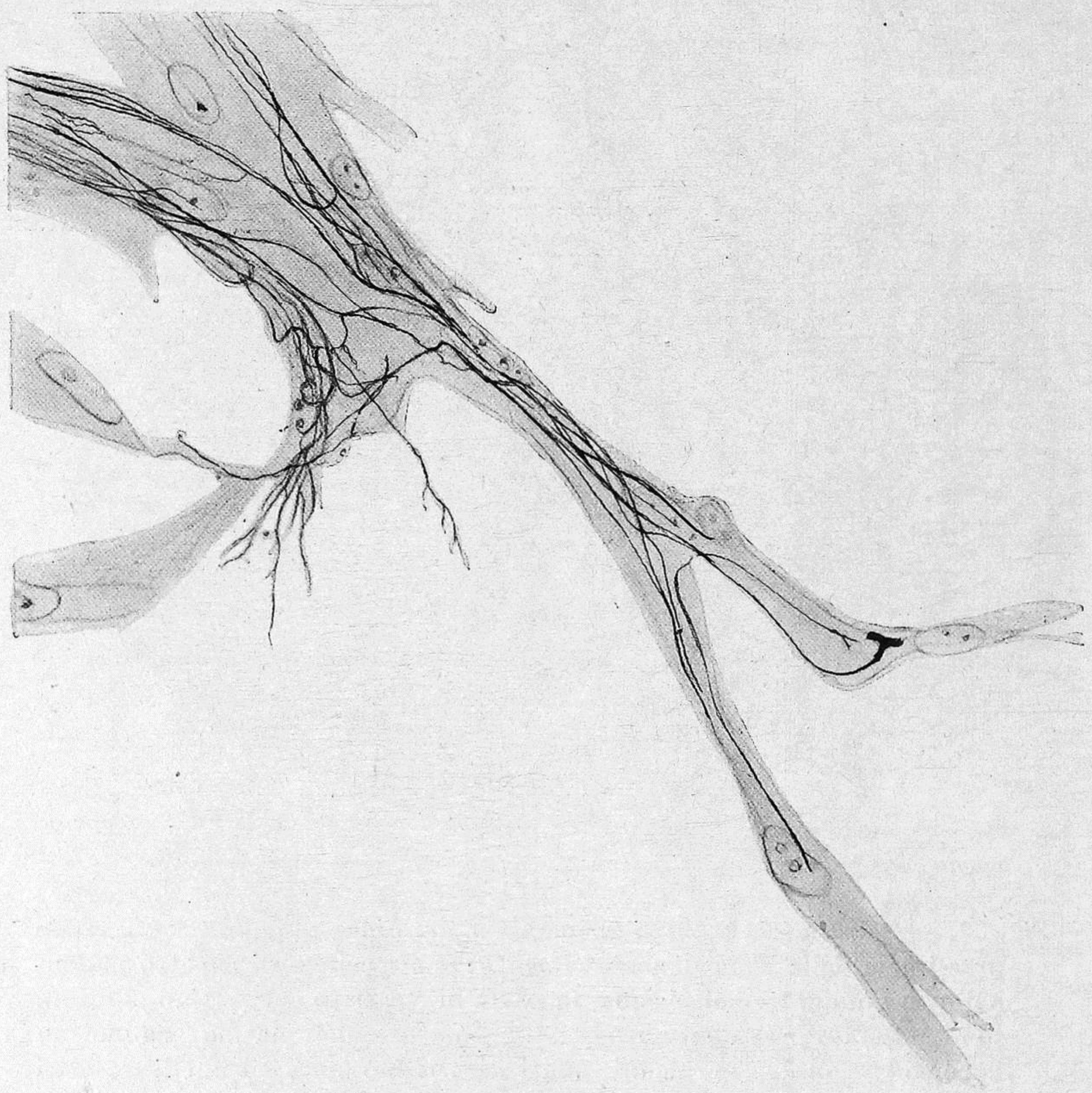

Fig. 33. — Parte periferica della stessa coltura disegnata a fig. 32, estremo distale dei plessi di fibre in rapporto abbastanza caratteristico con cellule a forma allungata. Ingr. 355 ×.

sma (fig. 32) ; invece in connessione con queste vi sono altre cellule affusate disposte in serie (fig. 33 e Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *o*). Il rapporto si accentua nella parte periferica della zona di accrescimento, ove le cellule appiattite sono più scarse e molti plessi di fibre nervose sono accompagnati da cellule affusate, disposte in

lunghe file sul tragitto del plesso ; in varie regioni si vede che le cellule si plasmano esattamente al suo contorno, come nella coltura descritta più sopra, in altre lo oltrepassano alquanto (fig. 33).

Analizziamo più davvicino la disposizione più caratteristica, la corrispondenza fra la forma dei cordoni di cellule satelliti e le fibre, la quale però è soltanto in rare colture comune a tutti i plessi ; in tal caso non vi sono cellule nell'intervallo fra le fibre ; l'adattamento fra forma delle cellule e forma del plesso è perfetto ; ove il plesso o la rete ha contorno rotondeggiante, le cellule sono globose come nella fig. 31 ; ove invece i plessi e le reti sono orientati radialmente rispetto all'espianto, le cellule sono strette ed allungate (figg. 33-34, Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *o*); e nella parte periferica della coltura, ove ciascun plesso si riduce a poche fibre, si vede un'unica fila di cellule a forma di sottili fusi. In qualche punto, ove il plesso è più semplice, si vedono due fibre le quali delimitano esattamente il contorno della cellula.

Interessante è l'adesione che in molti punti si vede fra le espansioni terminali o coni di accrescimento e le cellule. Questo rapporto è molto accentuato a fig. 34 ; si vede una fibra che termina con un cono fibrillare il quale abbraccia il polo prossimale di una cellula, mentre un'altra fibra dapprima strettamente aderente alla prima fibra, se ne separa e termina con un'espansione a rete aderente alla cellula stessa. E non di rado si vede una fibra od un plesso di fibre dissociarsi in una rete di filamenti esili, e ricostituirsi più oltre (*Entbündelung* degli Autori tedeschi). Anche in questo caso le reti fibrillari aderiscono intimamente a cellule. Oppure le fibre presentano lungo il tragitto dei rigonfiamenti irregolari talora cospicui (fig. 32), simili a quelli di alcune fibre di singole regioni dei centri nervosi dell'organismo.

Ci rimane ora da rintracciare le modalità con cui i rapporti fra neuriti e cellule satelliti si istituiscono, e la natura di quest'ultime. La convinzione che noi ci siamo formata sulla scorta ai fatti osservati è la seguente : delle cellule di aspetto mesenchimale sorte dall'espianto, una gran parte emigra sulla superficie del vetrino, e non ha perciò rapporto colle fibre, altre invece sono attratte dai plessi di fibre, aderiscono strettamente ad essi e finiscono col modellare la propria forma a quella del plesso ; e probabilmente quest'adattamento di forma avviene lentamente, per cui soltanto in singoli punti è completo, in altri è in divenire. È possibile che le cellule siano

attratte dalle fibre da azioni chemiotropiche, in nessun caso accade l' inverso, come vuole GRIGORIEFF, perchè, ripetiamo le fibre, precedono le cellule in ordine di tempo.

Nelle colture di gangli i macrofagi sono rarissimi, a differenza di quanto LEVI e MEYER hanno visto nelle colture di encefalo di

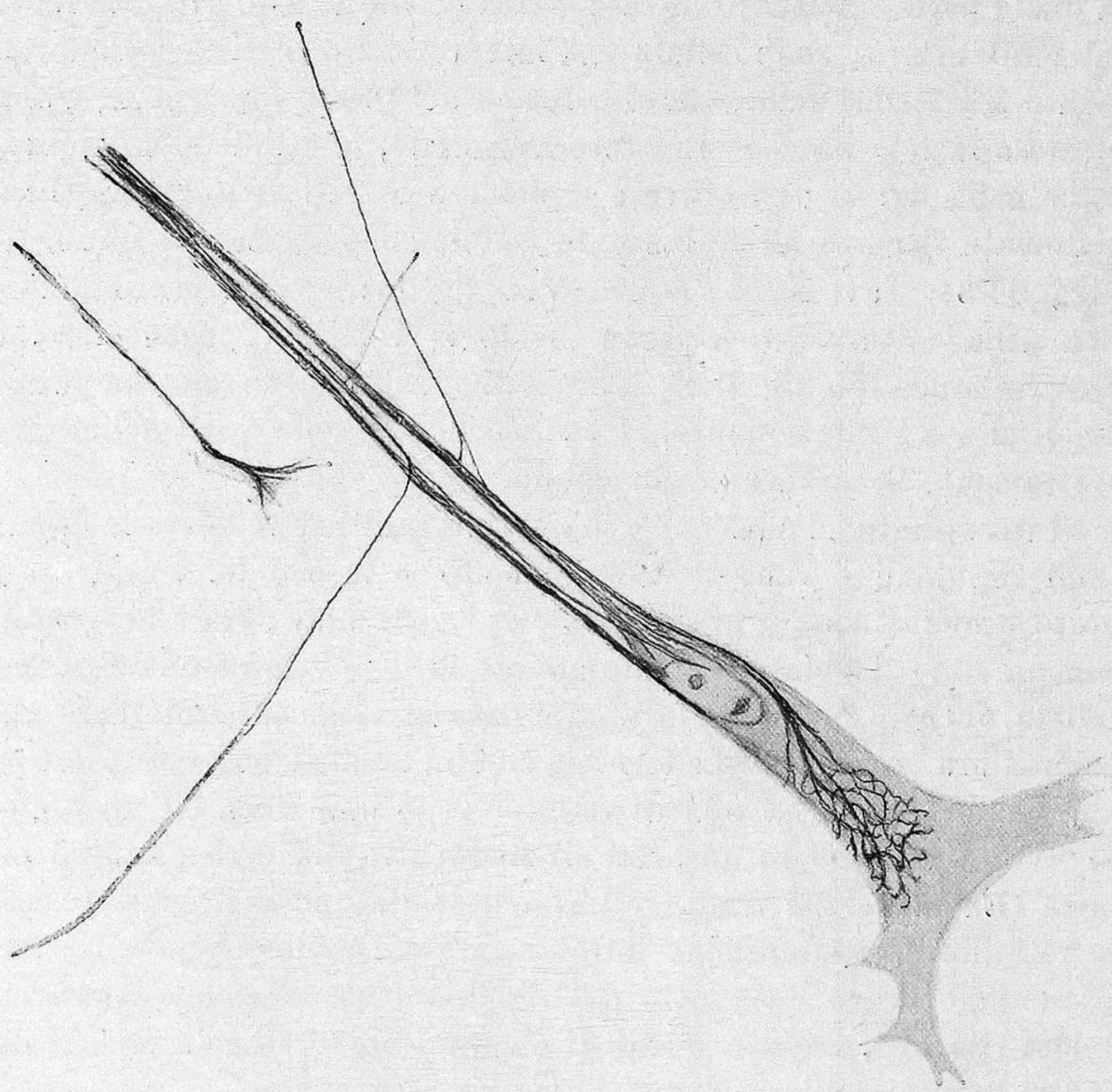

Fig. 34. — Coltura (N. 2138) di g. spinale di embrione di pollo (8° g.). Espansioni terminali provenienti da un plesso di fibre in intimo rapporto con una cellula di aspetto mesenchimale. Metodo all'Argento ridotto. Ingr. 1125 ×.

embrione di pollo, nelle quali sono numerosissimi i tipici macrofagi con membrana ondulante.

È importante che le cellule non aderiscono mai a fibre libere, solamente e con assoluta costanza alle fibre che formano plessi o reti, come ESAKI, e GRIGORIEFF hanno notato. E concediamo pure che, come ritiene ESAKI per effetto della connessione delle cellule

coll'espansione terminale, oppure con un tratto più prossimale alla fibra, la migrazione delle prime contribuisca a rendere più complicata la costituzione dei plessi. Anzi ci sembra probabilissimo che il decorso ricorrente dei neuriti, come pure le formazioni di anelli, di spire di anse (fig. 32) dipenda da migrazione delle cellule satelliti in senso opposto alla direzione di accrescimento di fibre. Però non ci sembra ammissibile che l'adesione fra cellule satelliti e fibre nervose sia condizione necessaria per la formazione dei plessi, perchè, lo ripetiamo, sono frequenti i plessi complicati anche in regioni della coltura ove mancano cellule. L'adesione delle fibre alle cellule non è adunque indispensabile per la formazione dei plessi, ma sembra favorirla. Comunque le condizioni che determinano la frequentissima, se non costante coincidenza fra la costituzione plessiforme delle fibre e la connessione di queste colle cellule satelliti ci sfugge.

In quanto alla natura di questi elementi, se veramente, come ritiene ESAKI, le cellule aderenti alle fibre abbiano davvero impronta citologica differente dalle altre e perciò siano da ritenere di origine diversa (lemnoblasti) non potremmo dare un giudizio deciso. Certamente le prime hanno sempre forma affusata, mentre le altre sparse nella zona di migrazione hanno i consueti caratteri delle cellule del mesenchima. Ma vi sono tante forme di passaggio fra le une e le altre, che ci sembra non del tutto inverosimile, che la forma affusata rappresenti un adattamento secondario, un fenomeno di stereotropismo ; le cellule adattano la propria forma a quella delle fibre, perchè queste hanno una maggior consistenza.

Del resto lo stesso ESAKI fa molte riserve sulla possibilità di istituire sovra criteri citologici una netta distinzione fra cellule satelliti dei plessi ed elementi mesenchimali.

« .... my opinion is based upon their morphological features and the fact that these cells wander very early, and that, while they are at first very few in number, they multiply very rapidly by mitosis during the succeeding days.

» But it is scarcely possible in every case to distinguish between sheath cells and mesenchyme cells in the living condition and also in the stained preparations ; this is especially the case far from the explantate, where several cells are migrating ; in such places every cell spreads out flatly, increases its size and loses its characteristic ».

Secondo ESAKI GRIGORIEFF e K. BAUER il rapporto fra le fibre e cellule satelliti non è soltanto di adesione ; le fibre penetrereb-

bero nel citoplasma delle cellule. E GRIGORIEFF accentua l'amalogia fra le anse e gli anelli intercalati sul decorso dei sottili filamenti oppure situati all'estremità di questi, frequenti nelle colture, colle strutture analoghe studiate specialmente da BOEKE nei corpuscoli nervosi terminali.

BOEKE ha molto insistito sull' importanza che avrebbe questa concrescenza fra neurofibrille e cellule epiteliali e mesenchimali dei corpuscoli. Certamente i corpuscoli terminali sono un materiale più adatto delle colture, per l'analisi di questi rapporti ; ed invero le figure che BOEKE ha presentato nei suoi più recenti lavori sono così chiare da non lasciar dubbi in proposito. Ma per il minimo spessore delle cellule migrate nel coagulo è difficile decidere se nelle colture i filamenti nervosi penetrano nel citoplasma od aderiscono alla sua superficie.

GRIGORIEFF attribuisce grande importanza, per la conservazione della struttura degli elementi nervosi, al rapporto materiale con cellule mesenchimali, epiteliali, muscolari ; questo substrato vivente dovrebbe avere influenza protettiva sugli elementi nervosi. Se il «substrato vivente » manca, fibre e cellule nervose regredirebbero rapidamente. Ed anche SZANTROCH ammette che le colture di simpatico, nelle quali si ebbe migrazione di mesenchima, sopravvivono un po' più a lungo delle altre.

Uno di noi, per l'esperienza acquistata sulle colture di tessuto nervoso, concede che le cellule non nervose migrate nel plasma favoriscono la sopravvivenza degli elementi nervosi, ritiene però eccessiva l' importanza attribuita da GRIGORIEFF a questo substrato vivente (LEVI 1934). Il significato dei rapporti, certamente interessanti, fra neuriti ed elementi di altra natura rimane tuttora enigmatico.

I PLESSI E LE RETI NERVOSE NELLE COLTURE DI GANGLI SPINALI.

Abbiamo parlato incidentalmente del modo con cui si formano, ora vogliamo dire come le reti si modificano e si accrescono.

I rami dei neuriti che crescono liberi dall'espianto nel plasma si anastomizzano per l'estremità terminale o con collaterali. Ed in molte colture partecipano alla formazione della rete anche i neuriti di cellule emigrate.

A seconda del numero e dello spessore delle collaterali, del modo con cui si suddividono, le reti prendono caratteri vari ; su questi particolari non ci soffermeremo più a lungo.

E così pure superflua ci sembra un'ulteriore discussione sull'esistenza reale di anastomosi. Se è vero che spesso un plesso a fibre sottili può simulare una rete, le cinematografie diedero la prova sicura della continuità materiale fra due rami, quando si uniscono in un' arcata anastomotica (pag. 478 e seg.). E sebbene una prova così decisiva non possa esser data per le anastomosi fra i rami più esili, i quali non impressionano la pellicola, le imagini viste nei preparati col metodo Cajal sono eccezionalmente convincenti: ove ad es. nel punto di unione dei filamenti della rete si vedono minuscoli nodi, nessun istologo può ammettere vi sia soltanto contatto.

Vogliamo invece accentuare la transitorietà delle strutture che l'osservatore sorprende in un momento determinato; l'accrescimento della coltura non è soltanto quantitativo, è accompagnato da mutamenti qualitativi così imponenti, che se durante lo studio di una coltura vivente l'osservazione è interrotta, anche per un breve periodo di tempo, le particolarità analizzate in precedenza divengono irriconoscibili.

Di grande aiuto in quest' indagine ci furono le cinematografie, sebbene non ne sia facile l' interpretazione e sebbene non ci dicano nulla sul destino delle reti più fini. Per questa via ci siamo convinti che le anastomosi fra i neuriti e le collaterali sono quasi sempre transitorie; le connessioni dopo qualche tempo si liberano ed i neuriti continuano a crescere, ma formano nuove collaterali, e per di più la zona di accrescimento si arricchisce di nuove fibre emerse tardivamente dall'espianto o provenienti da neuroni migrati nel plasma; gli uni e gli altri si uniscono ai rami preesistenti. Si potrebbe a prima vista attribuire queste trasformazioni a fattori meccanici; i neuriti, i quali crescono liberamente alla periferia della coltura ed anche le cellule nervose migranti potrebbero esercitare una trazione sui componenti della rete e contribuire ad interrompere le connessioni fra questi. Ma lo studio delle cinematografie dimostra che le cose stanno diversamente.

Tutto ciò dipende da quella meravigliosa e vivacissima attività ameboide che i neuroni esplicano. Uno di noi, quando iniziò le ricerche sulle colture di tessuto nervoso, riteneva che l'attività ameboide si manifestasse principalmente coll' emissione di sottili filuzzi, poi riassimilati rapidamente. Ma le cinematografie ci hanno svelato un'altra forma di attività ameboide dei neuriti, più lenta della prima, ma molto più imponente; si vedono scomparire rami

anastomotici anche cospicui perchè riassimilati dal tronco al quale appartengono, e più tardi se ne formano di nuovi in un altro punto. Così la costituzione delle reti muta di continuo, ed inoltre per il numero sempre crescente di rami che crescono nel plasma si complica sempre più.

Mutamenti non meno imponenti furono sorpresi nelle reti che appaiono nella parte prossimale della zona di accrescimento per vacuolizzazioni in seno ai nastri fibrillari, i quali sono derivati da una trasformazione dei neuroni (pag. 496). Queste reti in un primo tempo sono costituite da trabecole grossolane, poi si assottigliano ; contemporaneamente la forma della rete muta di continuo, in gran parte per attività ameboide dei suoi componenti ; alcuni di questi scompaiono mentre in altri punti se ne formano di nuovi.

APPENDICE.

Brevi cenni sui caratteri delle colture di gangli simpatici.

Le nostre ricerche su quest'argomento furono molto limitate. Esse furono intraprese in via incidentale al fine di stabilire, se ed in quanto le colture di neuroni simpatici differiscono da quelle di neuroni sensitivi.

Le colture di simpatico furono poco studiate (Lewis e Lewis, Szantroch). Szantroch ha espiantato in vitro di embrioni di 6-9 giorni il complesso di gangli conosciuto col nome di nervo intestinale di Remak. In circa il 40 % ebbe colture di tessuto nervoso, negli altri casi colture miste, per la migrazione di elementi mesenchimali. Frequente è la migrazione di neuroblasti multipolari. I prolungamenti dei neuroblasti si anastomizzano formando vere reti ; queste sarebbero più frequenti nelle colture di simpatico che in quelli dei centri nervosi.

Furono coltivati alcuni gangli della catena del simpatico di embrioni di pollo al 10° giorno d' incubazione, separati dal componente sensitivo. In confronto alle colture di ganglio sensitivo ad uno stadio corrispondente le fibre cresciute nel plasma sono più sottili, di spessore più uniforme. La disposizione a plesso è più intricata e si vede in tutta la zona di accrescimento. Le fibre sono

dappertutto anastomizzate (Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *q*). Le maglie della rete sono in alcune regioni ampie, in altre più strette, e vi sono pure reti a filamenti esilissimi (cfr. Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *r*, con fig. 35) ; come nelle colture dei gangli, nella parte prossimale della coltura si vedono plessi e reti complicatissime (fig. 35).

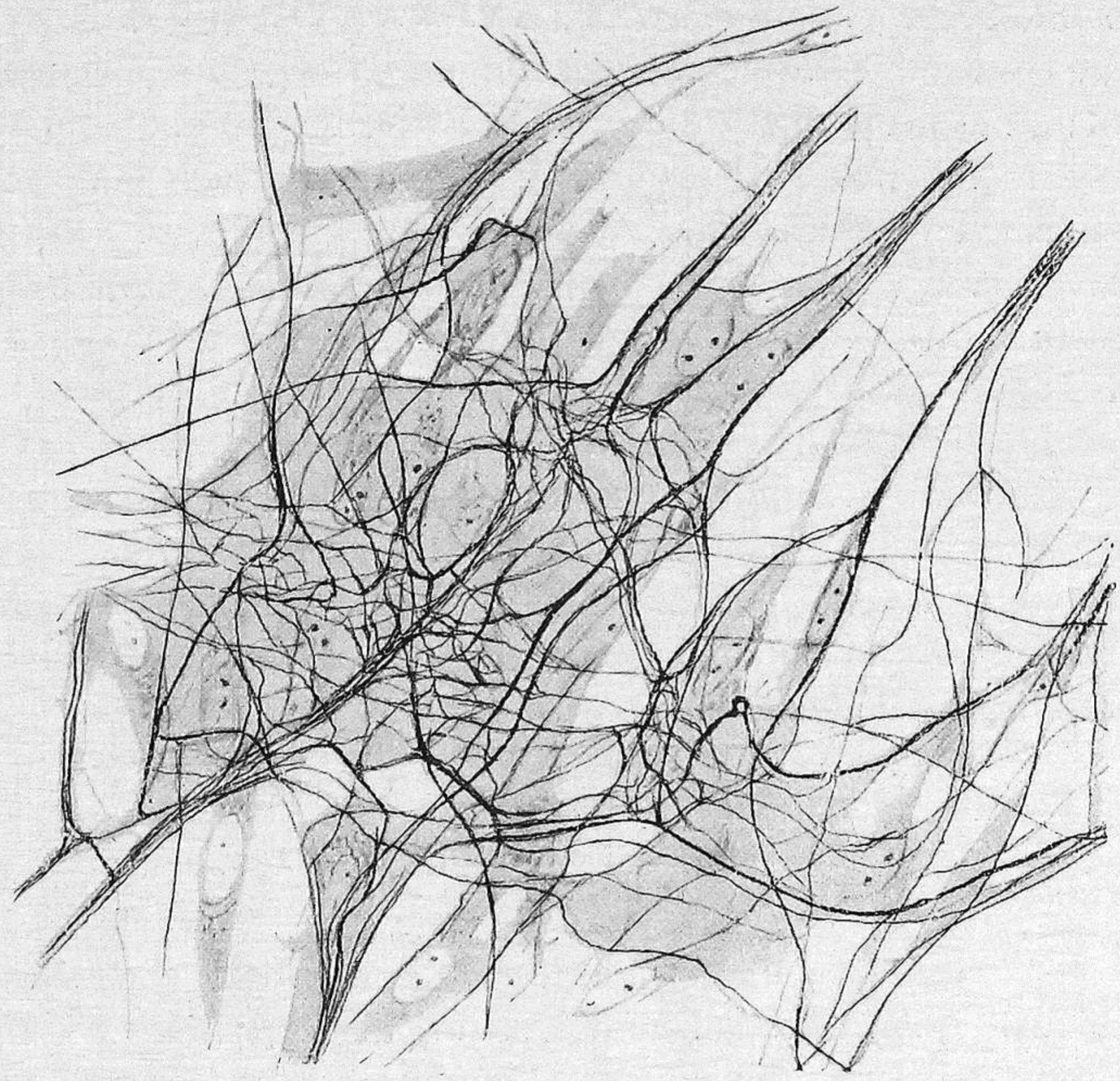

Fig. 35. — Coltura (N. 2113) di g. simpatico di embrione di pollo (10° g.). Parte prossimale della zona di accrescimento, anastomosi numerosissime fra i plessi di fibre. Cellule mesenchimali migrate. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 465 ×.

In quanto alla derivazione delle fibre che crescono nel plasma, esse sono, come quelle delle colture di gangli sensitivi, in parte cresciute da neuroni, in via di evoluzione, in parte rigenerati ; ed in una coltura abbiamo constatato direttamente la rigenerazione di fibre da un moncone privo di cellule nervose.

L'estremità ameboide della fibra non ha caratteri particolari, solamente è più piccola e più tenue che nelle fibre spinali, spesso

s'espande in una lamina poco colorabile, con filamenti pallidi. Numerosi sono i cordoni fibrillari simili a quelli delle colture di gangli spinali; distalmente (Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *s*) questi cordoni si suddividono a ventaglio in un pennello di cordoni meno cospicui ed anche di fibre sottilissime; gli uni e le altre sono anastomizzate fra di loro e con fibre contigue; però all'estremo distale crescono libere nel plasma (Tav. XXXVI-XXXVII, fig. *s*).

Sui caratteri delle cellule nervose emigrate non possiamo dir niente; nelle poche colture da noi allestite non ne abbiamo viste. Molto caratteristico è il rapporto dei plessi e dei fasci colle cellule di apparenza mesenchimale. Anche quì come in molte colture di gangli sensitivi, si vedono file di cellule allungate, la forma delle quali si adatta esattamente al plesso di fibre; e come nelle colture di gangli spinali si vedono spesso fascetti di 2-3 fibre, le quali delimitano il contorno di un' unica cellula molto allungata (fig. 35).

In complesso le differenze nei caratteri della zona di migrazione di colture di gangli spinali e simpatici sono di lieve grado, sebbene lo ripetiamo, riconoscibili da un occhio esperto, sia per la costante costituzione plessiforme delle fibre, sia per l'assenza di grosse fibre che terminano liberamente.

Riassunto e Considerazioni.

1. — I risultati delle nostre ricerche confermano che colla tecnica attuale della coltivazione dei tessuti *non è possibile di riprodurre nella cosidetta zona di accrescimento un tessuto il quale abbia analogia col tessuto nervoso degli organismi*; manca soprattutto l'armonia nei rapporti reciproci fra gli elementi nervosi che è tanto costante nell'organismo; *i neuroni manifestano un accrescimento esuberante e caotico delle propaggini e la forma, caratteristica per ciascun tipo di neurone, si modifica.*

Per il momento questo metodo può soltanto far conoscere particolari attinenti alle proprietà biologiche generali che gli elementi nervosi esplicano in un ambiente diverso da quello dell'organismo.

2. — Le colture di gangli sensitivi di embrioni di pollo dal 5° al 15° giorno d' incubazione e di embrioni e feti umani, per la disposizione plessiforme delle fibre nervose, per le frequenti anastomosi, per il numero di cellule nervose e di elementi di aspetto me-

senchimale che vi migrano, hanno caratteri propri, diversi da quelli delle colture di encefalo e di midollo.

Alle lievi differenze qualitative fra colture ottenute da espianti a stadi di sviluppo differenti non si può dar troppo valore, per la variabilità individuale nei caratteri di colture, anche se sviluppate da espianti a pari grado di maturità.

3. — *I neuroni sensitivi migrano nel plasma per movimento ameboide del pirenoforo, e da quel momento, pur conservando alcuni caratteri specifici dei neuroni, perdono quelli propri degli elementi di gangli sensitivi*; la forma del pirenoforo diviene irregolare; essa muta di continuo e, sempre per la vivace attività ameboide che manifestano, si differenziano vari neuriti.

Il neurone sensitivo bipolare diventa adunque multipolare con prolungamenti ramificati, attratti verso la periferia della zona di accrescimento. Per la sua forma, per il modo di origine dei prolungamenti, per il numero di questi, esso non differisce sensibilmente da un neurone dell'asse cerebro-spinale.

A trasformazioni ancor più importanti vanno soggette alcune cellule gangliari; non appena hanno abbandonato l'espianto, si espandono in lamine allungate a struttura fibrillare (non costante). *Di solito 2-3 neuroni confluiscono in un unico nastro, che cresce come una fibra gigantesca per movimento ameboide*. Più tardi il nastro si ramifica e fornisce collaterali; e dopochè in seno ad esso si sono scavate delle fessure, e dopochè queste si sono ampliate, *le cellule nervose espanse finiscono col trasformarsi in una rete a strette maglie*. È singolare che anche neuroni molto maturi (di embrioni sino al 15° giorno d'incubazione) possono andar soggetti a trasformazioni di così alto grado.

4. — *I neuroni che rimangono in seno al tessuto originario mutano invece di poco in confronto a quelli emigrati nel plasma, i propri caratteri*. La sostanza neurofibrillare rimane integra, conservano forma sferica, aumentano di volume, possono da bipolari diventare unipolari, come se avessero continuato a far parte dell'embrione.

La reazione al nuovo ambiente dei neuroni rimasti nell'espianto si manifesta colla tendenza alle divisioni ripetute dei neuriti, a breve distanza dall'origine, coll'emissione dal pirenoforo di neuriti accessori, che si ramificano nell'espianto e nel plasma nello stesso modo dei neuriti tipici; infine negli espianti più maturi i pirenofori emettono propaggini coi caratteri di parafiti.

5. — L'analisi dei caratteri morfologici e delle modalità di accrescimento dei prolungamenti delle cellule nervose emigrate nel plasma diminuisce il valore della distinzione fra neuriti e prolungamenti protoplasmatici (dendriti), alla quale l'Istologia descrittiva attribuisce tanta importanza e che ha del resto un fondamento reale, se si tien conto di ciò che si vede nel tessuto nervoso degli organismi. Ma i neuroni sensitivi emigrati nel plasma hanno prolungamenti tozzi e d'aspetto protoplasmatico, simili ai dendriti nel tratto iniziale, sottili ed identici ai neuriti più distalmente ; ed essi si ramificano e si accrescono con modalità analoghe a questi ultimi. *Senza voler diminuire l'importanza che la distinzione fra neuriti e dendriti ha per l'Istologia descrittiva, ci sembra che tale distinzione riposi non sovra differenze essenziali, ma dipenda da lievi e contingenti variazioni nel modo con cui il pirenoforo nel formare i prolungamenti esplica la propria attività ameboide*

6. — Una differenza di comportamento fra tessuto originario e zona di accrescimento sussiste anche in colture di altri organi altamente differenziati, ad es. per il cuore, e dipende forse dalle diversità dell'ambiente umorale fra espianto e zona di accrescimento, e forse anche dai rapporti materiali reciproci che intercedono nell'espianto fra neuroni ed elementi di altra natura (mesenchimali, amficiti, lemnoblasti), rapporti che non esistono sempre nel plasma.

7. — I numerosissimi neuriti che crescono nel mezzo di coltura hanno varia origine : *a*) in prevalenza sono rami di divisione e collaterali dei neuriti tipici, oppure di neuriti accessori di cellule rimaste nel tessuto originario e già differenziate nel momento in cui il ganglio fu espiantato, ma in minor grado di altre, per cui il neurite non era ancora arrivato a far parte della radice ; *questi neuriti sono cresciuti con un processo analogo a quello dell'ontogenesi normale, soltanto assumono un tragitto diverso*, essendo attratti verso la periferia del ganglio dagli eccitamenti che il mezzo di coltura esplica su di essi ; *b*) alcuni pochi neuriti derivano forse da cellule non ancora differenziate al momento in cui il ganglio fu espiantato, e che si sono differenziate in vitro; ma se mai quest' è verosimile per gangli di embrioni sino al 10° giorno, non certo per gangli più maturi, nei quali la riserva di elementi indifferenti è certamente esaurita ; *c*) *molti neuriti sono rigenerati in vitro da fibre, le quali facevano già parte della radice e che furono mutilate nel momento in*

cui il ganglio fu separato dall'embrione ; *d) altri neuriti derivano da cellule nervose immigrate nel plasma* trasformate in elementi multipolari, oppure espanse in superficie (nastri fibrillari, v. più sopra).

8. — Le cinematografie delle colture di gangli viventi hanno confermato che durante un certo periodo i neuriti provenienti dal tessuto originario crescono indipendenti nel mezzo.

Il più sovente dopo un periodo di tempo, che può essere anche brevissimo, *i rami neuritici liberi s'incontrano e si uniscono per l'estremo distale, e per rami collaterali. L'unione può prodursi fra rami di uno stesso neurite o fra rami di neuriti diversi. Fu data la prova sicura della continuità di sostanza nel punto di unione.* Però le anastomosi sono ben di rado definitive ; spessissimo rami che si erano anastomizzati all'estremo ridivengono liberi e continuano a crescere. Oppure collaterali grosse e sottili che collegavano fibre contigue sono riassimilate dalla fibra principale. *Le reti che si vanno formando nella zona di accrescimento mutano di continuo la propria costituzione per l'attivissimo ameboidismo dei neuroni* ; però, nonostante la comparsa di molte anastomosi, poichè nuove connessioni si istituiscono di continuo colle fibre cresciute più di recente, la rete diviene sempre più complessa. Con modalità diverse si formano le reti a strette maglie della parte prossimale della zona di accrescimento ; essi derivano dal sistema di trabecole le quali si sono formate a spese di neuroni espansi in superficie (v. più sopra).

9. — *I rapporti di interdipendenza fra gli elementi nervosi nella zona di accrescimento delle colture di gangli sono adunque molto diversi che nel tessuto originario, nel quale i neuriti si ramificano, ma in nessun caso si anastomizzano.*

Però le modalità con cui le ramificazioni dei neuriti si anastomizzano, variano. In alcune colture, specialmente in quelle ottenute da gangli molto maturi (di embrioni al 14°-15° giorno d'incubazione), i neuriti provenienti da suddivisione dei neuriti delle cellule gangliari dell'espianto sono uniti da collaterali sottili, ma conservano di solito la propria individualità. In altre colture si vedono anche anastomosi ad arcata, o ad angolo acuto fra i grossi rami cresciuti dall'espianto, e fra i neuriti di cellule emigrate nel plasma.

In molte colture si vede una fitta rete a due dimensioni, di fibre di vario spessore ; da grossi rami anastomotici si va per gradi a reticoli di fibre sottilissime ed a strette maglie. Di solito i rami

anastomotici robusti prevalgono nella parte prossimale della zona di accrescimento, i sottili, nella distale, mentre nella zona marginale le fibre sono libere. Le condizioni le quali determinano differenze così rilevanti nei caratteri delle varie colture non furono rintracciate.

Insistendo su ciò che ha maggiore importanza generale, sta il fatto obiettivamente provato che *in molte colture le connessioni fra i singoli neuroni diventano tanto numerose, che l'individualità di essi sembra scomparsa.* Se questa scomparsa sia reale od apparente non sappiamo. Uno di noi aveva supposto che anche quando l' individualità anastomica dei neuroni è apparentemente scomparsa «una parte del protoplasma nervoso rappresentato dal neurite e dalle sue collaterali, il quale si trova sotto la dipendenza del neuroblasta, per oscure affinità biologiche mantenga con quest'ultimo dei rapporti funzionali più intimi, dimodochè ad un certo momento possa rendersi un'altra volta indipendente», (Levi, 1917).

Riteniamo che quest' importante problema possa essere indagato e forse risolto sperimentalmente. Se si dimostrasse che un' interruzione nella continuità in un punto delle rete in una zona di accrescimento di una coltura, prodotta col micromanipolatore o colla radiopuntura, determina processi regressivi circoscritti e non diffusi nelle fibre della rete, come dovrebbe invece avvenire se l' individualità dei neuriti fosse scomparsa, l'attendibilità di quell' ipotesi di lavoro verrebbe ad essere obiettivamente dimostrata. Per quali ragioni nella zona di accrescimento delle colture di gangli sia così pronunziata la tendenza alle anastomosi, e perchè questa non si manifesti sempre in tutte le colture, non sappiamo. La stessa questione è stata posta per il problema della persistenza o della scomparsa dell' individualità dei fibroblasti, dei mioblasti e degli epiteli. Riteniamo erroneo di formulare il principio dell' indipendenza cellulare in antitesi con quello della struttura sinciziale, perchè ambedue le possibilità possono verificarsi. La persistenza o la scomparsa dell'individualità è forse in relazione con mutamenti nelle proprietà della membrana, interposta fra mezzo e protoplasma, per cui nei punti di contatto fra due unità distinte, i due protoplasmi confluiscono, (Levi, 1934).

Nelle cinematografie di colture di gangli abbiamo visto che *le anastomosi fra i neuriti si hanno soltanto ove questi esplicano movimento ameboide*, vale a dire fra le espansioni o coni di accrescimento

dei neuriti e delle collaterali. Naturalmente la prova sicura di ciò fu data soltanto per le collaterali apprezzabili nei film, non per le reti più esili. Si vedono due coni di accrescimento che si avvicinano, arrivano più volte a contatto, si discostano di nuovo e soltanto dopo ripetuti tentativi si fondono. Ciò fa pensare che per *la continuità materiale fra rami nervosi sia indispensabile uno speciale strato fisico del cono di accrescimento od anche di un punto limitato di esso* (*forse diminuzione della tensione superficiale*) *il quale soltanto in singoli momenti diviene di entità sufficiente.*

10. — Da espianti di gangli sensitivi migrano nel mezzo cellule di aspetto mesenchimale, alcune delle quali derivano dal mesenchima, altre dall'abbozzo del ganglio, le seconde diventano satelliti delle cellule gangliari e delle fibre nervose (amficiti e lemnoblasti). *Alcune di queste cellule possono talora acquistare secondariamente rapporti materiali stretti con plessi di fibre nervose, e la loro forma si adatta a quella dei fasci e del plesso.* Non è ben dimostrato che le strette connessioni delle fibre siano una prerogativa delle cellule derivate dall'abbozzo del ganglio.

Talora per l'adesione delle cellule in migrazione alle fibre nervose, queste sono trascinate in direzione diversa dall'iniziale. Forse questo fattore contribuisce a determinare la costituzione plessiforme delle fibre, ma esso non può essere essenziale, perchè *l'adesione delle cellule alle fibre nervose, è sempre secondaria, inoltre si ha soltanto in alcune colture, e per lo più è circoscritta a singole regioni.*

11. — Le colture dei gangli della catena del simpatico differiscono per qualche carattere da quelle dei gangli sensitivi, le fibre sono sottili e di spessore uniforme, formano dappertutto plessi e reti. Anche in queste colture vi è abbondante migrazione di cellule satelliti, le quali aderiscono in un secondo tempo ai plessi di fibre nervose.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE.

(Le microfotografie furono riprodotte senza ritocco).

Tavole XXXII-XXXIII.

Fig. *a*. — Coltura (N. 2179) di ganglio spinale di embrione di pollo (al 12° g. d'incubaz.) al 3° giorno di vita. In punti limitati dell'espianto alquanto assottigliato vi sono cellule gangliari in parte bipolari, in parte unipolari con prolungamenti a T (invisibili a quest'ingrandimento). Dal contorno dell'espianto si irradiano nel plasma neuriti isolati o riuniti in tronchi o nastri fibrillari ; le anastomosi dappertutto sono numerose, in alto poi in numero stragrande. I neuriti formano, sin dal punto in cui emergono dall'espianto, plessi e reti complicate. Non vi è migrazione di cellule nervose, soltanto di cellule mesenchimali e lemnoblasti, non però in gran numero (non si distinguono nella figura). In alto fascio trasversale di neuriti (v. testo). Metodo all'argento ridotto. Ingr. 40 ×.

Fig. *b*. — Coltura (N. 2381) da un ganglio spinale di embrione di pollo (10° g. d'incubaz.) ; assieme al ganglio fu espiantato un lungo tratto di radice. Assottigliamento spontaneo del ganglio per migrazione attiva delle cellule come nelle figg. 3-6. Accrescimento di fibre dalla radice nel plasma : molte di queste, in Fr, sono rigenerate dalle fibre preesistenti della radice nel punto in cui fu recisa, al momento in cui l'espianto fu allestito. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 65 ×.

Fig. *c*. — Coltura (N. 2198) da un ganglio spinale di embrione di pollo (14° g. d'incubaz.) ; microfotografia di una parte dell'espianto originario, nel quale le cellule si sono considerevolmente dissociate per migrazione attiva. Le cellule hanno differente grado di maturità ; alcune hanno neuriti multipli. Ingr. 380 ×.

Fig. *d*. — Coltura (N. 2146) da un ganglio spinale di embrione di pollo (8° g. d' incubaz.). Parte periferica della zona di accrescimento ; fibre a disposizione in prevalenza plessiforme, molte terminano liberamente ; vi sono però anche anastomosi. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 230 ×.

Tavole XXXIV-XXXV.

Fig. *e*. — Coltura (N. 1730) da un ganglio spinale di embrione di pollo (7° g. d' incubaz.). Neuriti riuniti a fasci ed in plessi ; nella parte più periferica della coltura, il plesso diviene più intricato. Anastomosi molteplici, più numerose alla periferia. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 470 ×.

Fig. *f*. — Coltura (N. 1993) da un ganglio spinale di embrione di pollo (8° g. d'incubaz.). Parte distale della zona di accrescimento, fibre a disposizione plessiforme, collegate da numerosissime anastomosi (rete a strette maglie). Si noti la grossa fibra a decorso tangenziale, la quale unisce distalmente le fibre a decorso radiale (si tratta di vera anastomosi). Nella parte più distale singole fibre terminano liberamente. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 560 ×.

Fig. *g*. — Coltura (N. 2200) da un g. spinale di embrione di pollo (14° g. d'incubaz.). Zona di accrescimento, neuriti ramificati collegati da anastomosi multiple, in qualche punto rete a strette maglie, molte cellule migrate non di natura nervosa (alcune non a fuoco) in basso una di queste è in mitosi. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 300 ×.

Fig *h*. — Zona di accrescimento di una coltura di un g. spinale di embrione di pollo (7° g. d'incubaz.)., fotografata vivente alla fine del 2° giorno di vita. Robuste anastomosi fra i neuriti e fra le collaterali di questi. Alcune cellule nervose migrate con neuriti ramificati ed anastomizzati coi neuriti cresciuti dall'espianto. Le fibre sono sovrapposte in vari piani (quelle a doppio contorno non sono perfettamente a fuoco). Per la retrazione del coagulo si è formata una lacuna *E* fra espianto e plasma. Ingr. 85 ×.

Fig. *i*. — Dalla parte prossimle della zona di accrescimento di una coltura di g. spinale di embrione umano di 62 mm. di lungh. Tre cellule nervose emigrate ; l'una a destra si continua in un largo prolungamento, che distalmente si assottiglia ; la 2ª emette molti lunghi prolungamenti, la 3ª (in basso) si è espansa in un lungo nastro. Ingr. 235 ×.

Fig. *k*. — Dalla zona di accrescimento di una coltura vivente di ganglio spinale di embrione di pollo (7° g. d'incubaz.). Varie cellule nervose a forma triangolare ed affusata migrate nel plasma con neuriti multipli anastomizzati (rete a larghe maglie). Ingr. 350 ×.

Fig. *m*. — Tronco appiattito a nastro a struttura fibrillare fotografato da una coltura vivente di g. spinale di embrione di pollo al 7° g. Il tronco si costituisce per la riunione di due cellule nervose *Cn* ; all'estremo distale si divide in vari rami anastomizzati. Ingr. 450 ×.

Tavole XXXVI-XXXVII.

Fig. *l*. — Dalla parte prossimale della zona di accrescimento di una coltura di g. spinale di embrione di pollo al 7° g. Varie cellule nervose emigrate a forma lamellare, a contorno poliedrico e triangolare, emettono vari neuriti ramificati ; anastomosi multiple, la rete è a maglie allungate nella direzione della migrazione. Fissaz. liq. Zenker. Ematoss. Held. Ingr. 340 ×.

Fig. *n*. — Fascio di neuriti intimamente aderenti a costituzione plessiforme senza rapporto di sorta con cellule migrate, (cfr. con fig. *o*, nella quale il fascio è in rapporto con cellule). L'individualità dei singoli neuriti è ben apprezzabile, sebbene essi s' intreccino in modo complicato, (cfr. col nastro fibrillare a fig. *m* il quale rappresenta un tutto unitario); lungo il suo decorso emette neuriti isolati che terminano liberamente; in qualche punto si vedono espansioni terminali. Così si spiega come il numero dei neuriti che compongono il plesso vada gradatamente diminuendo distalmente. Dalla coltura N. 1731 di un ganglio di embrione di pollo al 7° g. d'incubazione. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 450 ×.

Fig. *o*. — Fascio di fibre, compatto nel tratto prossimale, assume più distalmente costituzione plessiforme. Alcune cellule a forma allungata sono in intimo rapporto col fascio di fibre, altre contigue, mggiormente espanse in superficie non hanno rapporto col fascio (dalla coltura 1740 di ganglio di embrione di pollo al 7° g.). Metodo all'argento ridotto. Ingr. 485 ×.

Fig. *p*. — Parte periferica della zona di accrescimento di una coltura di g. spinale di embrione di pollo al 12° g. Ramificazioni di tronchi fibrillari, anastomosi multiple fra i rami di uno stesso tronco e di tronchi contigui, in qualche punto reti a strette maglie ed a fibre sottili. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 550 ×.

Fig. *q*. — Dalla zona di accrescimento di una coltura di ganglio simpatico (N. 2113) embrione di pollo al 10° g. Anastomosi numerosissime (disposizioni a rete), distalmente ramificazioni libere. Metodo all'argento ridotto. Ingr. 100 ×.

Fig. *r*. — Parte periferica della coltura N. 2113, (fig. *g*), a più forte ingrandimento. Ingr. 260 ×.

Fig. *s*. — Un'altra regione della coltura N. 2113 (simpatico). Tronchi piuttosto sottili ramificati ed anastomizzati l'uno coll'altro mediante sottili fibre. Ingr. 420 ×.

BIBLIOGRAFIA.

Bauer K.: Beobachtungen über das Wachstum von Nervengewebe « in vitro ». Z. mikrosk. anat. Forsch. 28, 47-80. — **Esaki S.:** A sûre method for the elective staining of neurofibrillae in tissues cultivated « in vitro » Z. wiss. Mikrosk. 46, 369-376, 1929. — **Id.:** New studies of nervous tissues cultures in vitro. C. R. Assoc. Anat. 24me Réun., 223-235, 1929. — **Grigorieff L. M.:** Differenzierung des Nervengewebes ausserhalb des Organismus. I Mitt. Arch. exper. Zellforsch. 11, 483-519, 1931. — **Id.:** Id. II Mitt. Arch. exper. Zellforsch. 13, 195-220. — **Lazarenko T.:** Ein Bei-

trag zur Morphologie des Wachstums von embryonalem Nervengewebe «in vitro». Arch. exper. Zellforsch. 11, 555-590. — **Levi G.:** Connessioni e struttura degli elementi nervosi sviluppati fuori dell'organismo. Memorie R. Accademia Lincei, 12, IV, 6-46, 1917. — **Id.:** Ricerche sperimentali sovra elementi nervosi sviluppati « in vitro ». Arch. exper. Zellforsch. 2. 244-272, 1925. — **Id.:** Il contributo portato dal metodo della coltivazione « in vitro » alla conoscenza della struttura del tessuto nervoso. Monit. Zool. it. 40, 302-313, 1929. — **Id.:** Explantation, besonders die Struktur und die biologischen Eigenschaften der « in vitro» gezüchteten Zellen und Gewebe. Ergebn. d. Anat. u. Entwick. Bd. 31, 1934. — **Levi G.** e **Meyer H.** Nuovi studi sul destino del tessuto nervoso espiantato in vitre. Psych. en Neurol. Bladen, Feestb, Ariens Kappers p. 497-513, 1934 — **Martinovic P. N.:** Migration of survival «in vitro» of the nerve cells cultivated in the cerebro-spinal fluid of the embryo and the young animal. Arch. exp. Zellf. 10, 145-156. — **Id.:** Survival in vitro of explants of the cerebral cortex of the cat cultivated in the cerebro-spinal fluid of the young animal. Arch. exper. Zellf. 12, 249-273, 1925. — **Mossa S.:** Les caractères optiques des fibres nerveuses poussées in vitro à l'observation dans l'éclairage à fond noir. C. R. Assoc. Anat., 21me Réun. 408-412, 1926. — **Id.:** Ulteriori studi sulla rigenerazione dei neuriti e sulle modificazioni dei neuroblasti dei gangli spinali di embrioni di pollo coltivati « in vitro ». Arch. exper. Zellforsch., 7, 413-443, 1929. — **Olivo O.:** Migrazione di elementi nervosi coltivati «in vitro». Arch. exper. Zellforsch. 4, 43-63, 1927. — Differenziazione e sdifferenziazione del tessuto nervoso embrionale di pollo coltivato per più settimane « in vitro ». Arch. exper. Zellforsch. 5, 46-76, 1927. — **Speydel C. C.:** Studies of living nerves, Journ. exper. Zool. 61, 1932. — **Id.:** Studies of living nerves II. Amer. of Journ. Anat. 52, 1933. — **Id.:** Growth, Irritation and Repair of Nerves. Arch. f. exper. Zellforschung. 15, 328-342, 1934. — **Szantroch Z.:** Beobachtungen an den Kulturen des Sympathikus. Ergebnisse der Züchtung des Remak'schen Darnnerven. Arch. exper. Zellforsch. 14, 442-452, 1933.

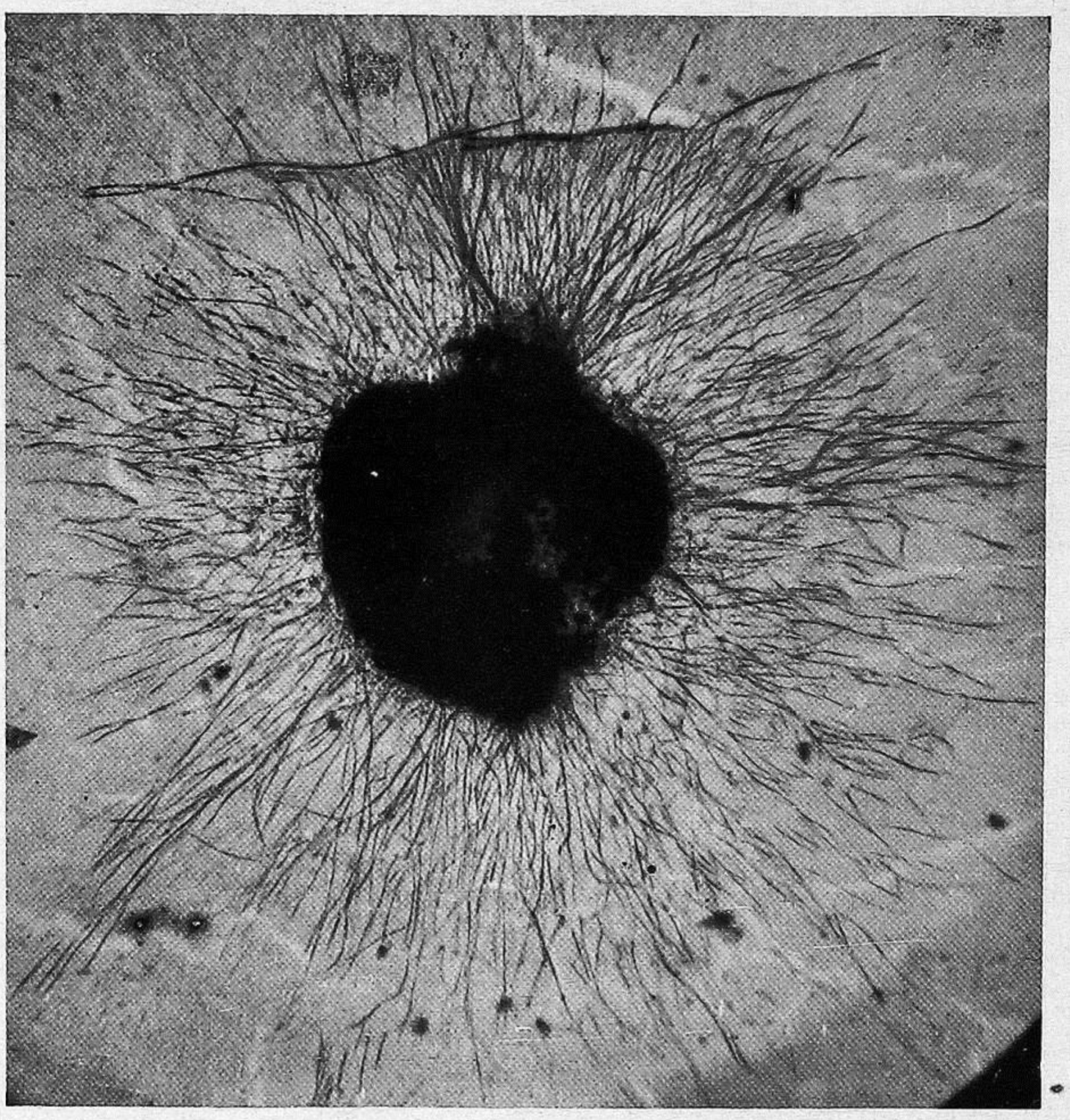

Fig. *a*

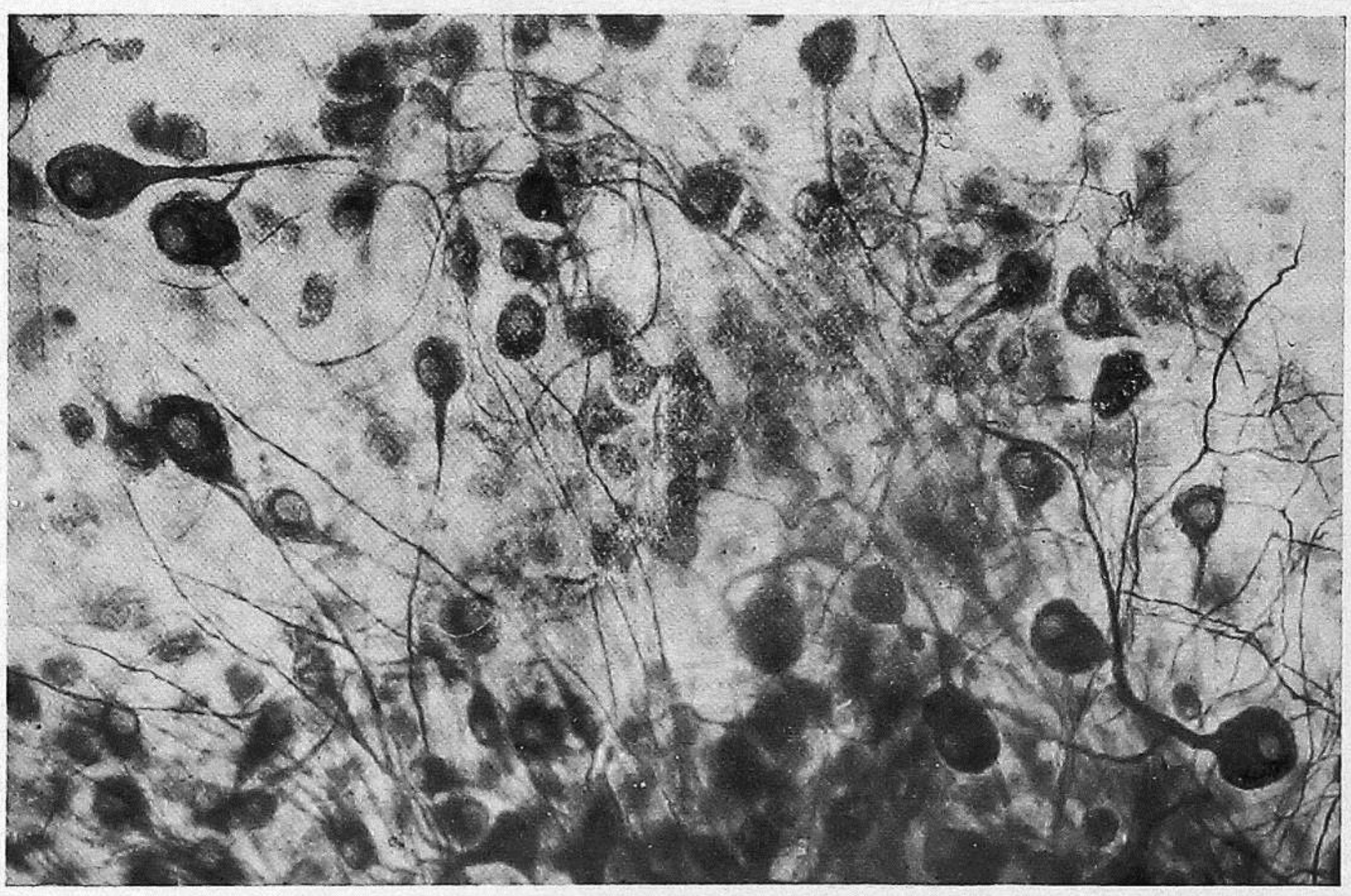

Fig. *c*

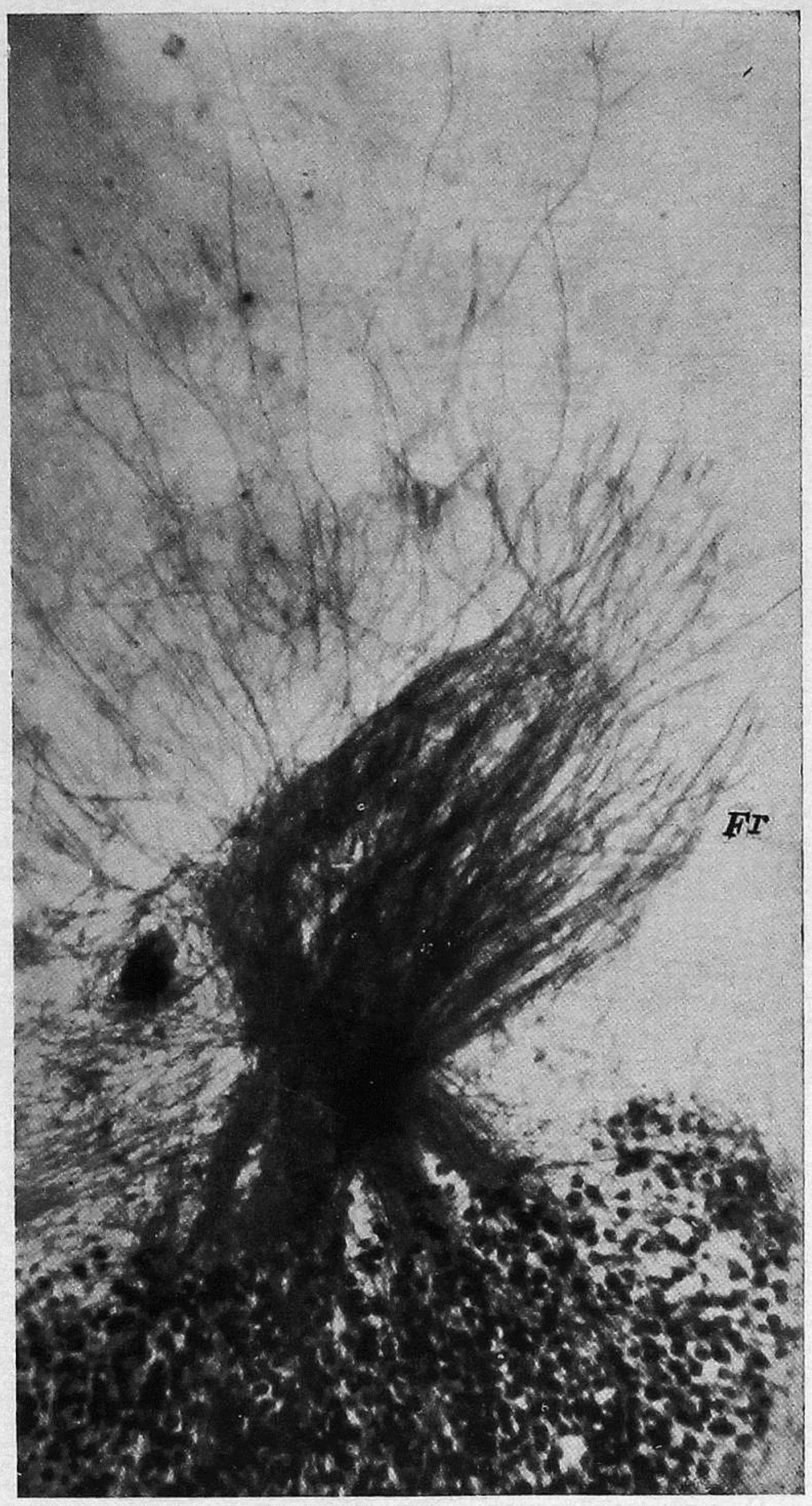

Fig. *b*

Fig. *d*

LEVI G. — DELORENZI E. — *Trasformazioni degli elementi dei gangli spinali e simpatici coltivati in vitro.*

Fig. *e*

Fig. *g*

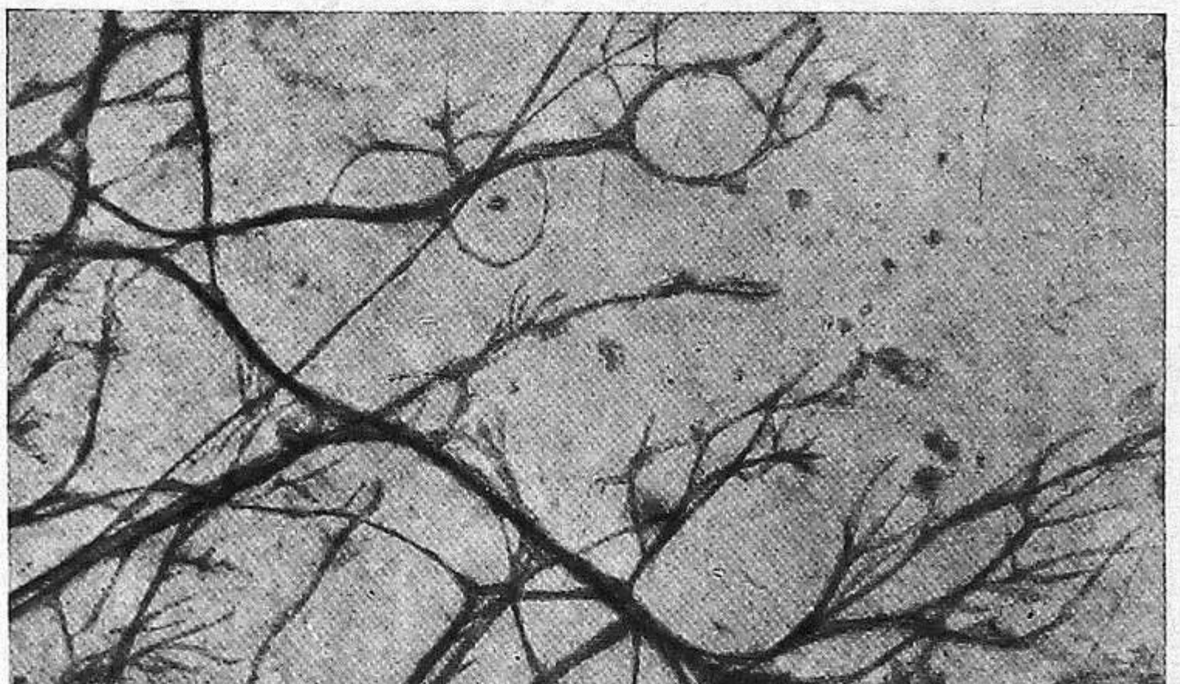

Fig. *f*

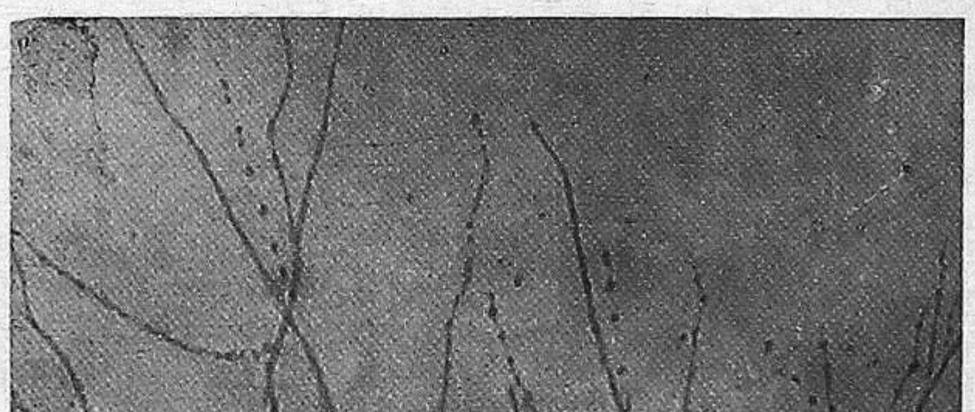

Fig. *i*

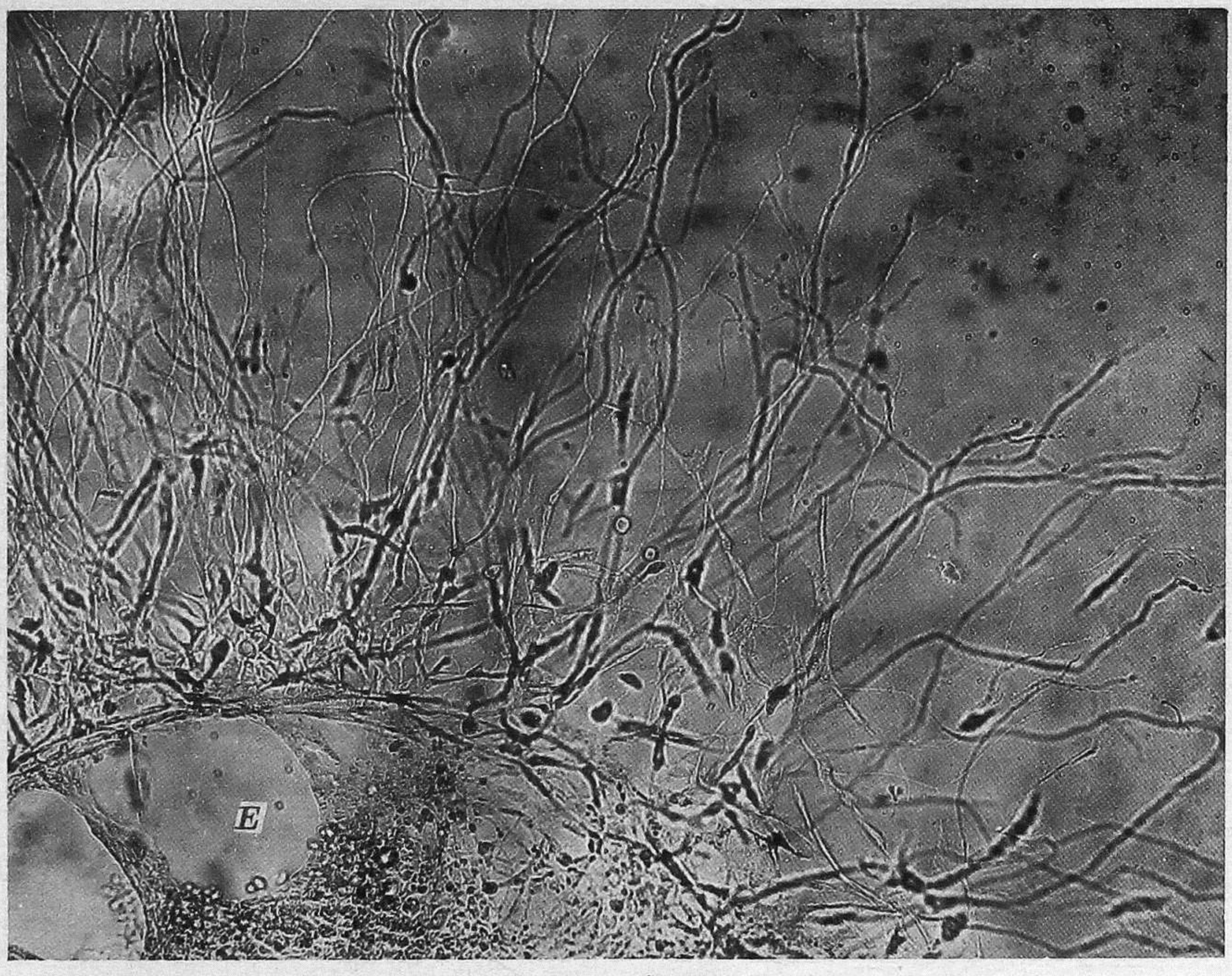

Fig. *h*

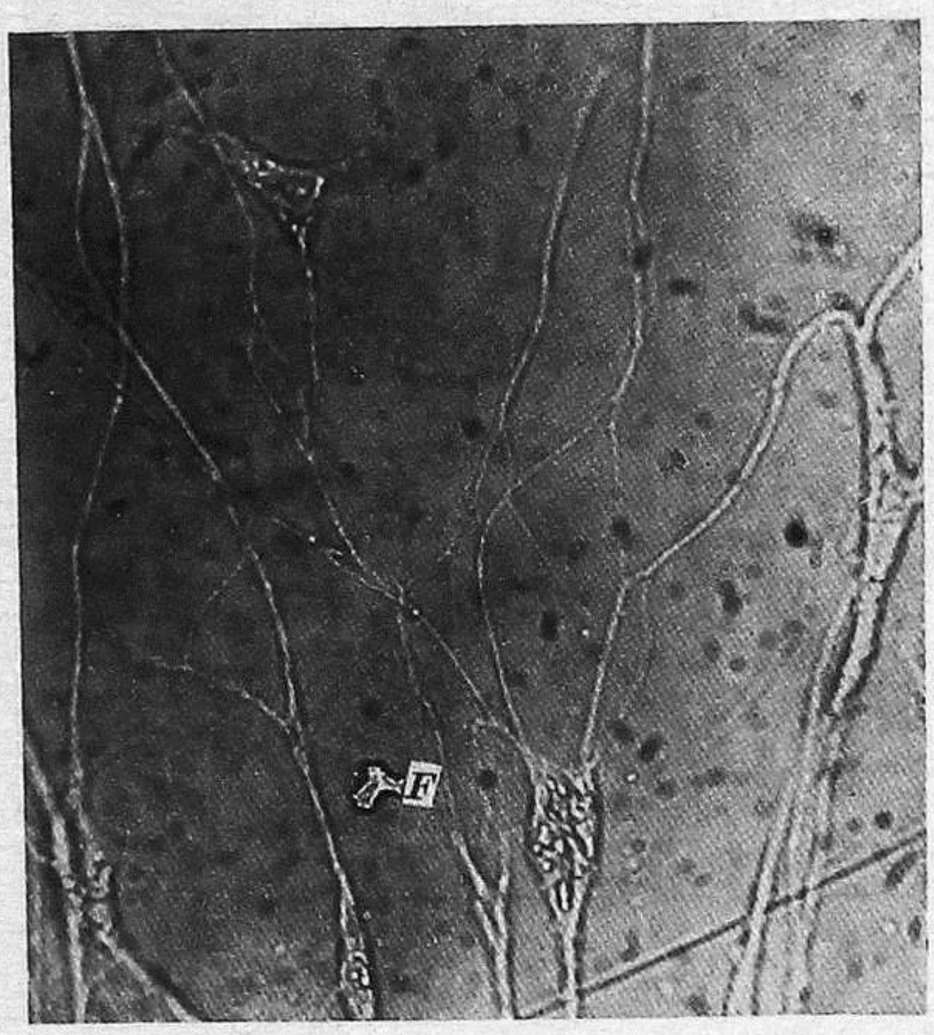

Fig. *k*

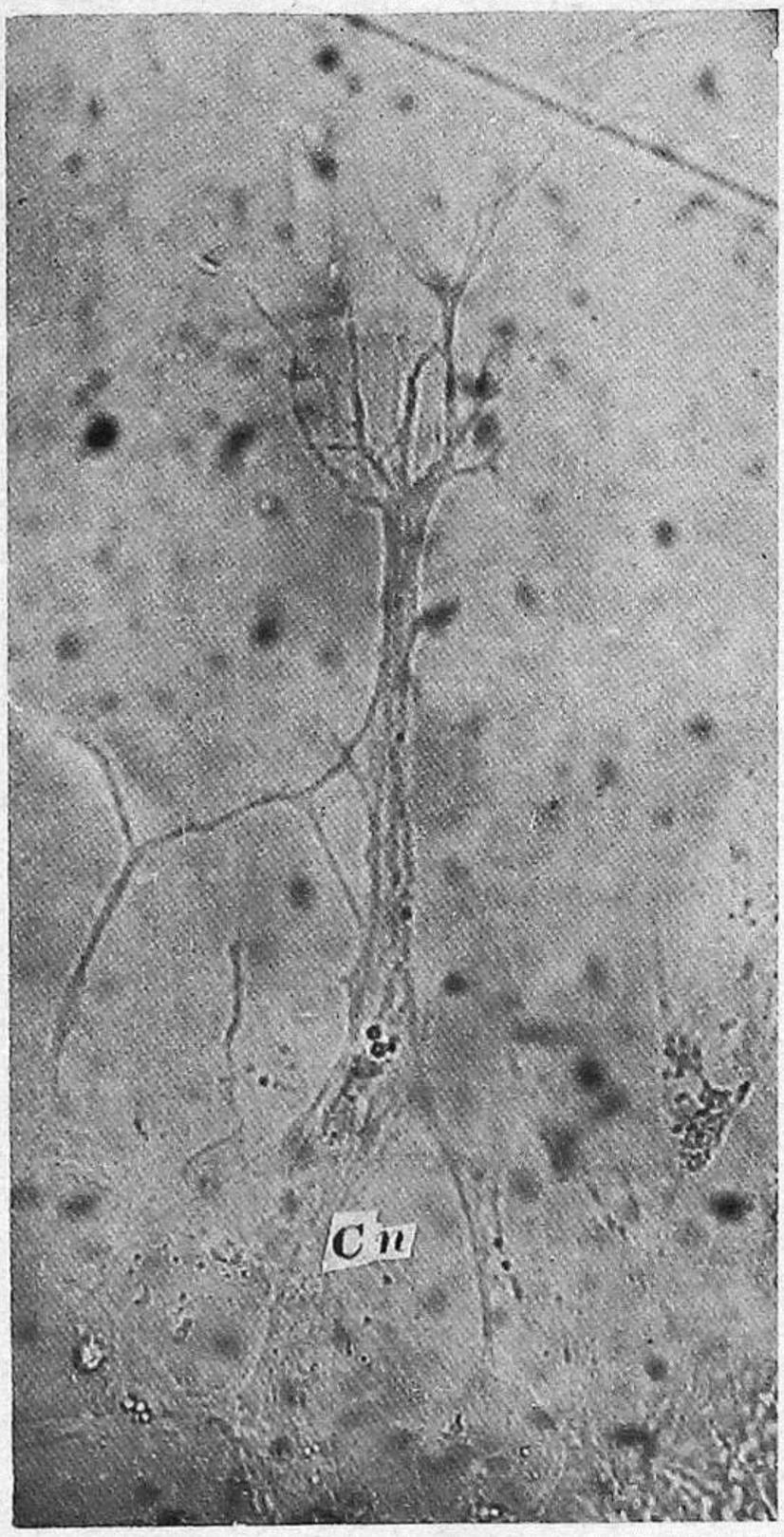

Fig. *m*

Fig. *l*

Fig. *r*

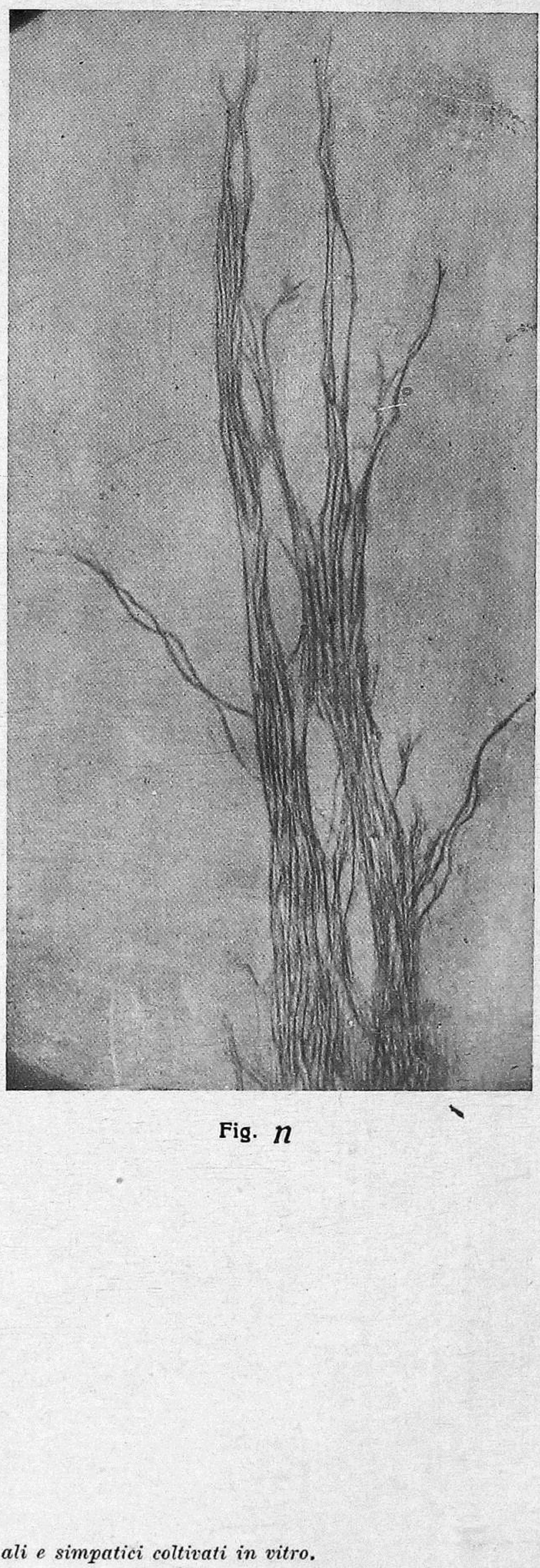

Fig. *n*

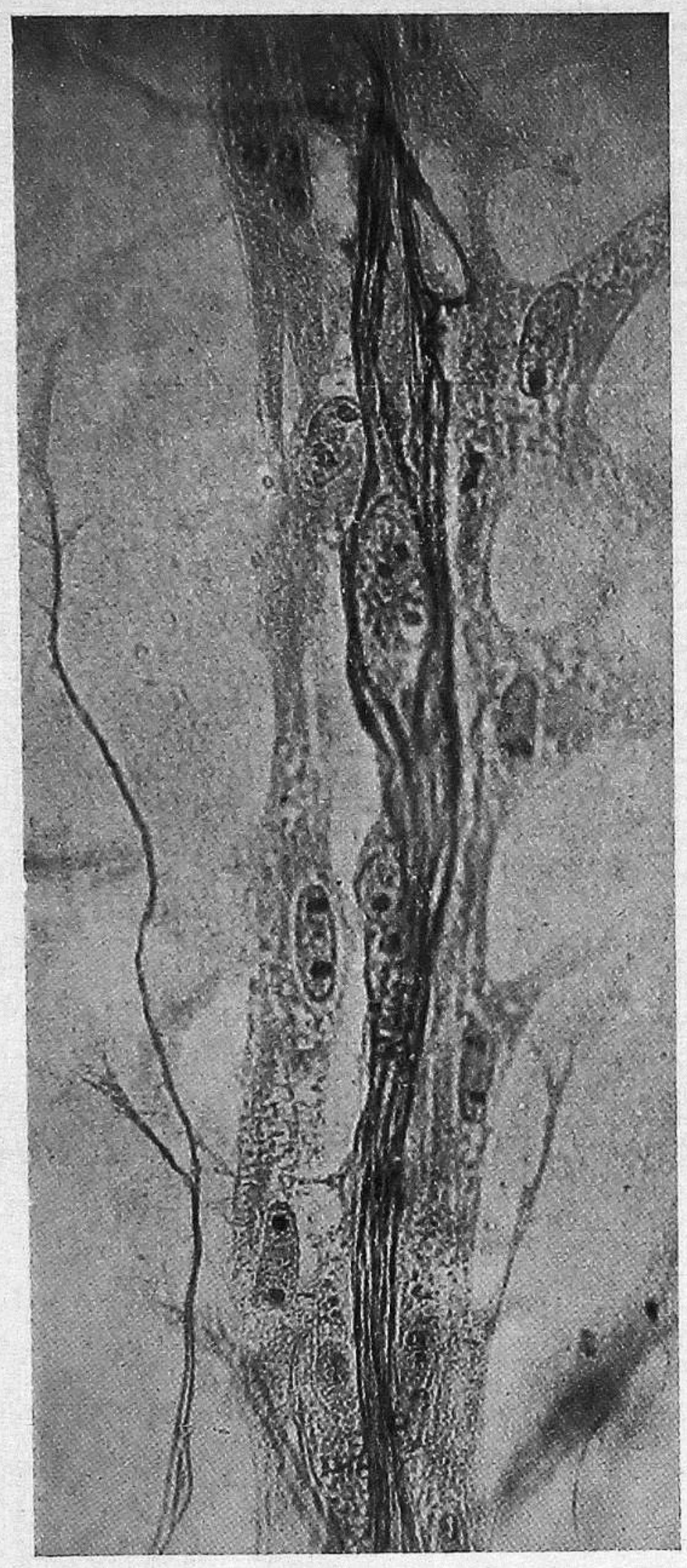

Fig. *O*

Fig. *S*

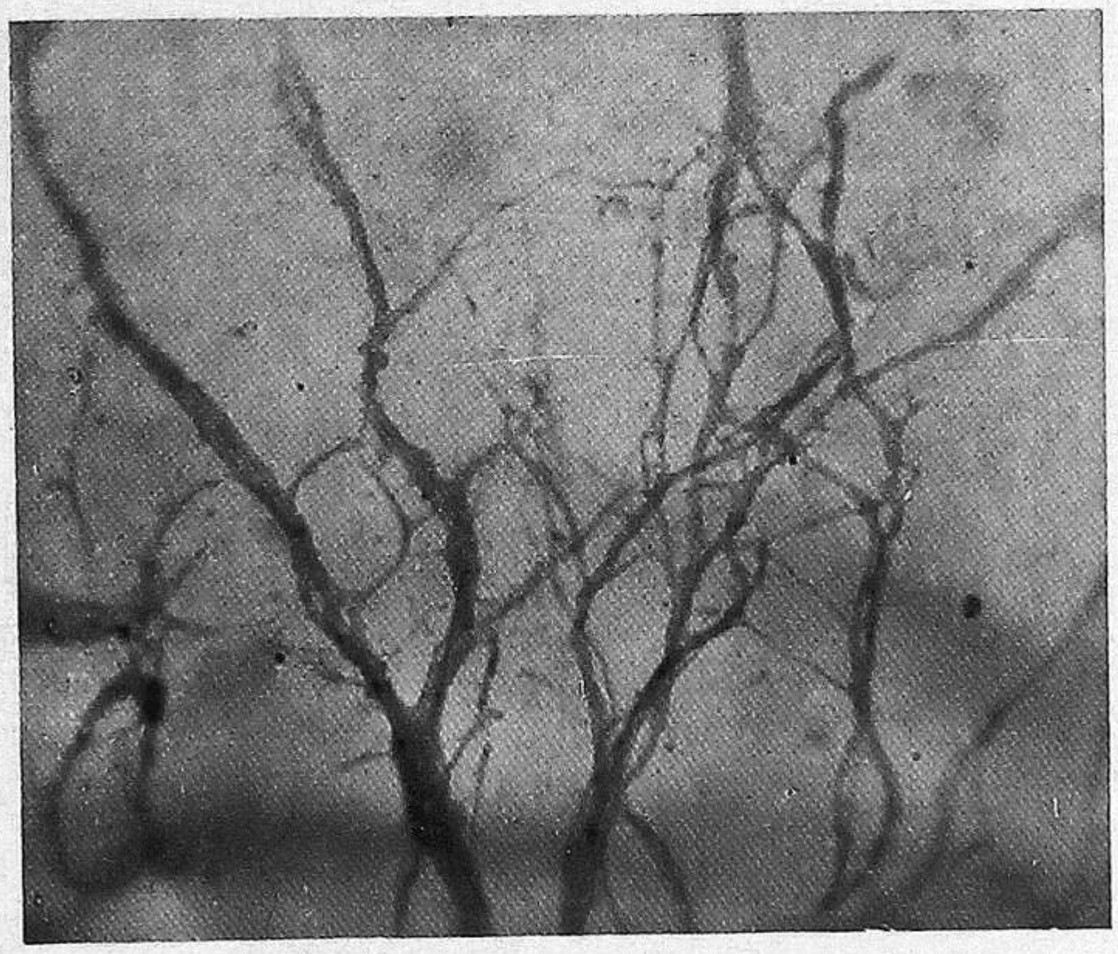

Fig. *p*

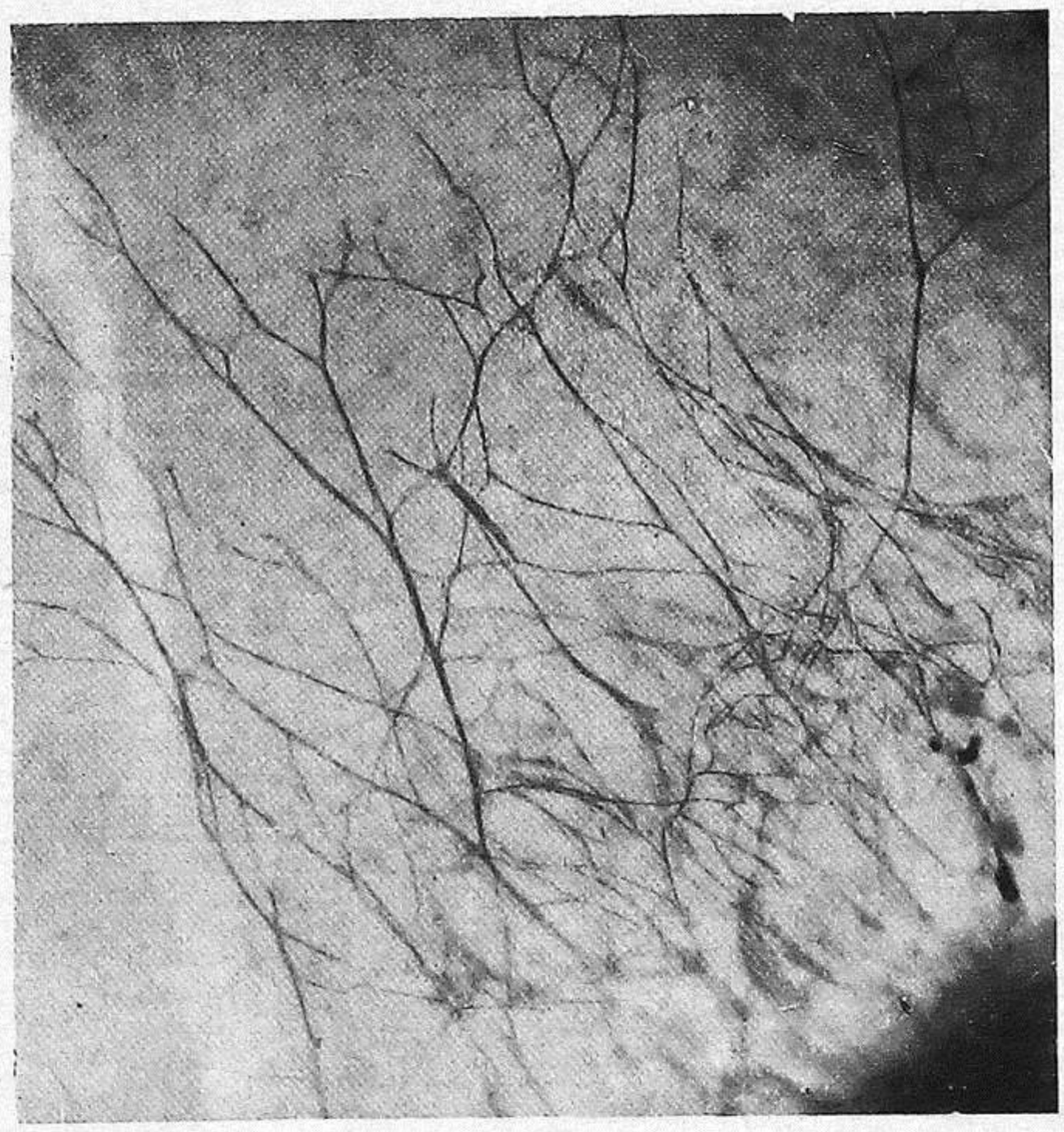

Fig. *q*

LEVI G. — DELORENZI E. — *Trasformazioni degli elementi dei gangli spinali e simpatici coltivati in vitro.*